



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado

Facultad de Ciencias Biológicas

Unidad de Posgrado

**Desarrollo de clones de *Trypanosoma cruzi* con
expresión estable de lucíferas para *screening* de drogas
tripanosomicidas**

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Biología
Molecular

AUTOR

Susy Fanny NÚÑEZ ZAPATA

ASESORES

Jorge ARÉVALO ZELADA

Robert GILMAN (Co-asesor)

Holger MAYTA (Co-asesor)

Lima, Perú

2010



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Núñez, S. (2010). *Desarrollo de clones de Trypanosoma cruzi con expresión estable de lucíferas para screening de drogas tripanosomicidas*. Tesis para optar el grado de Magíster en Biología Molecular. Unidad de Posgrado, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)
Facultad de Ciencias Biológicas

UNIDAD DE POSGRADO

Exped. N° 064-UPG-FCB-2009

**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR EL GRADO
ACADÉMICO DE MAGÍSTER EN BIOLOGÍA MOLECULAR**

Siendo las 18:25 horas del día 9/02/2010 en el Salón de Grados de la Facultad de Ciencias Biológicas, el Jurado Examinador presidido por:

Dra.	Hilda M. Solis Acosta	e integrado por
Mg.	Inés M. Gárate Camacho	(Miembro)
Mg.	Carmen A. Pantigoso Flores	(Miembro)
Mg.	Fernando O. Retuerto Prieto	(Miembro)
Dr.	Jorge Arévalo Zelada	(Asesor)

Se reunió para la sustentación oral y pública de la Tesis para optar el Grado Académico de Magíster en Biología Molecular, que solicitara la Bachiller Doña **SUSY FANNY NUÑEZ ZAPATA**.

Después de darse lectura al Expediente N° 064-UPG-FCB-09, en el que consta haberse cumplido con todas las disposiciones reglamentarias, los señores miembros del Jurado, recibieron la exposición de la Tesis Titulada:

"Desarrollo de clones de *Trypanosoma cruzi* con expresión estable de luciferasa para screening de drogas tripanosomicidas" , y formuladas las preguntas, éstas fueron absueltas por la graduando.



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)
Facultad de Ciencias Biológicas

UNIDAD DE POSGRADO

Acto seguido el Jurado procedió a la votación la que dio como resultado el calificativo de:

Muy Bueno nota 17

A continuación la Presidente del Jurado Examinador recomienda que la Facultad proponga que la Universidad le otorgue el grado académico de Magíster en Biología Molecular a la Bachiller

Susy Fanny Nuñez Zapata

Siendo las 19:50 se levantó la Sesión, recibiendo la graduando las felicitaciones de los señores miembros del Jurado y público asistente.

Se extiende la presente Acta en Lima, a los 4 días del mes de febrero del año 2010.

Dra. Hilda M. Solis Acosta
Profesora Principal a D. E.
PRESIDENTA

Dr. Jorge Arévalo Zelada
Profesor Principal a D. E. (UPCH)
ASESOR

Mg. Inés M. Garate Camacho
Profesora Principal a D.E.
MIEMBRO

Mg. Carmen A. Pantigoso Flores
Profesora Principal a D. E.
MIEMBRO

Mg. Fernando O. Retuerto Prieto
Profesor Principal a D. E.
MIEMBRO

ASESOR:

Jorge Arévalo, M.Sc.

CO-ASESORES:

Robert Gilman, M.D.

Holger Mayta, Ph.D.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Robert Gilman por haberme brindado la oportunidad de realizar mi tesis, y haberla financiado.

Al Dr. Jorge Arévalo, al Dr. Holger Mayta y a la Dra. Manuela Verástegui por haberme orientado en el desarrollo de mi tesis, formarme como una verdadera investigadora y por sus consejos tanto a nivel profesional como personal.

A todo el personal del Laboratorio de Investigación en Enfermedades Infecciosas, de la Facultad de Ciencias y Filosofía, de la Universidad Peruana Cayetano Heredia en especial al área de Inmunología, Biología Molecular y Tuberculosis con quienes compartí muchos momentos de trabajo y de quienes coseché grandes enseñanzas.

Mi gran aprecio y gratitud a los chicos del *Chagas Working Group in Peru*, por su amistad, tiempo y alegrías compartidas.

Un agradecimiento especial a Omar Chuquisana y Nieves Nole por su asistencia en el desarrollo de mi tesis.

Al Dr. Bucker (Departamento de Medicina, Universidad de Washington) y al Dr. Mariano Levi (Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular, Universidad de Buenos Aires) por donarme los plásmidos de expresión para *T. cruzi*.

A la Dra. Orjeda por facilitarme el uso del electroporador y espectrofotómetro nanodrop.

Mi agradecimiento infinito a mi familia porque siempre estuvieron conmigo apoyándome y dándome fuerzas durante todo el desarrollo de mi tesis.

Al Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica (CONCYTEC) por haber financiado mis estudios de postgrado.

CONTENIDO

Resumen

Abstract

Abreviaturas

INTRODUCCIÓN **01**

ANTECEDENTES **04**

La Enfermedad de Chagas 04

Quimioterapia 05

Sistemas de *screening* de drogas 05

Expresión génica en kinetoplastidos 07

La transfección en *Trypanosoma cruzi* 09

Mecanismos de Introducción del DNA 10

Principios de la Electroporación 11

La luciferasa y la bioquímica de la luminiscencia 11

MATERIAL Y MÉTODOS **12**

Cepas y cultivos de *Trypanosoma cruzi* 12

Construcción de plásmidos 12

Secuenciación y diseño de *primers* 15

Electroporación 15

Clonamiento y selección de parásitos 17

Análisis por Western Blot	17
Prueba de la actividad de la luciferasa	18
Prueba de la actividad de la β -galactosidasa	18
RESULTADOS	19
Construcción de los vectores de expresión del gen de la luciferasa	19
Obtención de parásitos transfectantes	22
Expresión de los genes de luciferasa y β -galactosidasa	23
Estabilidad de los genes reporteros	26
DISCUSIÓN	27
Construcción de plásmidos recombinantes para <i>T. cruzi</i>	27
Condiciones óptimas de electroporación para la transfección	28
Selección de parásitos transfectantes	29
De la transfección estable, DNA circular versus linear	30
Expresión de la luciferasa y de la β -galactosidasa	32
CONCLUSIONES	35
RECOMENDACIONES	36
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37
ANEXOS	46

RESUMEN

La enfermedad de Chagas, causada por el parásito *Trypanosoma cruzi*, es endémica de Latinoamérica y afecta entre 16 y 18 millones de personas. Su tratamiento requiere de drogas más efectivas y menos tóxicas. Con el propósito de contar con un método de *screening* de drogas más sensible y rápido que facilite la selección de compuestos tripanosomicidas candidatos, se planteó como objetivo desarrollar parásitos de *T. cruzi* que expresen el gen reportero de la luciferasa (*luc*) de la luciérnaga *Photinus pyralis* en forma estable.

Para la obtención de parásitos *luc*- transfectantes se construyeron dos plásmidos conteniendo el ORF de *luc*: el pBS-Neo-Luc y el pR-Luc-Neo. Epimastigotes de la cepa boliviana DH29 fueron electroporados con el DNA circular de estos plásmidos. Los clones fueron obtenidos por diluciones limitantes de los parásitos transfectantes resistentes al antibiótico G418. La inserción del gen *luc* y su expresión fue demostrada por PCR y *western blot*, respectivamente. La actividad de la luciferasa fue medida con un luminómetro manual.

Los clones que expresaron la luciferasa, medida por su actividad, fueron estables por más de seis meses en ausencia del antibiótico de selección y en los tres estadios de *T. cruzi*. La correlación entre la actividad de la luciferasa y el número de parásitos fue muy alta ($r^2 = 0,999$). La prueba de detección de la luciferasa fue altamente sensible, detectándose desde 10^2 parásitos ml^{-1} . Por tanto, los parásitos con expresión estable de luciferasa podrán ser usados para el *screening* de drogas tripanosomicidas.

Palabras Clave: transfección, luciferasa, *Trypanosoma cruzi*, *screening*.

ABSTRACT

Trypanosoma cruzi, the etiological agent of Chagas disease, affects 16-18 million people in Latin American countries. More effective and less toxic drugs are needed for its treatment. To establish a faster and more sensitive high-throughput screening method to measure anti-trypanosomal activity, we developed a stably transfected *Trypanosoma cruzi* strain expressing the firefly luciferase reporter gene (*luc*).

To obtain *luc*-transfectant parasites, we constructed two plasmids containing the open reading frame of *luc*. Epimastigotes from the Bolivian DH29 strain were electroporated using circular DNA from these plasmids. Clones were obtained by limited dilutions of the transfected G418-resistant parasites. The presence of *luc* gene and its expression were demonstrated by PCR and western blot, respectively. Luciferase activity was measured using a luminometer.

Clones expressing luciferase, as measured by luminometry, were stable for more than six months without selection and in each of the three life-cycle stages of *T. cruzi*. Correlation between luciferase activity and number of parasites was very high ($r^2=0.999$). The luciferase assay was highly sensitive, detecting as few as 10^2 parasites ml^{-1} . Therefore, parasites with stable expression of luciferase could be useful for trypanocidal drug screening.

Key words: transfection, luciferase, *Trypanosoma cruzi*, screening.

ABREVIATURAS *

CDC:	Centers for Disease Control and Prevention
CHAPS:	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate hydrate
CPRG:	Chlorophenol red-beta-D-galactopyranoside
DAB:	3,3'-diaminobenzidine
ELISA:	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
GFP:	Green fluorescent protein
LB:	medio Luria-Bertani
LIT:	medio Liver infusion tryptose
MTT:	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
OD:	Optical density
ORF:	Open reading frame
PAGE:	polyacrilamide gel electrophoresis
pb:	pares de bases
PBS:	Phosphate-buffered saline
PCR:	Polymerase chain reaction
RPMI:	medio Roswell Park Memorial Institute.
RLU:	Relative light unit
SDS:	Sodium dodecyl sulphate
TESA:	antígenos de excreción-secreción de <i>Trypanosoma cruzi</i>
Tm:	Temperature melting
UTR:	untranslated region
V:	voltios

*Las abreviaturas corresponden a los términos usados en inglés, obtenidos de la literatura científica

INTRODUCCIÓN

La tripanosomiosis americana es una infección parasítica, crónica, sistémica y endémica de América Latina causada por *Trypanosoma cruzi*. Se calcula que en todo el mundo hay entre 16 y 18 millones de personas infectadas, de las cuales cada año mueren 50 000 (OMS, 2008). Considerada como la enfermedad parasitaria con mayores consecuencias económicas en América Latina (OMS, 2007), la enfermedad de Chagas es controlada principalmente por la eliminación del vector doméstico y el análisis de la sangre de donadores en todos los países endémicos, la detección y tratamiento de la transmisión congénita, y la administración de tratamiento a los casos agudos y a los niños infectados (Maya *et al.*, 2007; OMS, 2007). Sin embargo, los principales problemas que la enfermedad enfrenta son el diagnóstico y la falta de drogas apropiadas para su tratamiento.

El tratamiento de la enfermedad de Chagas constituye un enorme reto social y científico debido a la carencia de una vacuna efectiva (McKerrow *et al.*, 2009) y a que las drogas disponibles, el nifurtimox y el benzonidazol, tienen poca o ninguna actividad en la forma crónica prevalente además de ser muy tóxicas (de Castro, 1993; OMS, 2007). Por tanto, se requieren urgentemente nuevas drogas que sean de baja toxicidad, de fármaco cinética favorable, de corto tratamiento, con mayor permeabilidad celular y bajo costo de producción (OMS, 2007). Con los avances en la química combinatorial se puede sintetizar en menor tiempo una gran cantidad de bibliotecas de entidades químicas diferentes. El *screening* de estas bibliotecas constituye una forma rápida y efectiva de encontrar drogas nuevas y activas. Sin embargo, el *screening* eficiente de compuestos anti- *T. cruzi* no es óptimo debido a la carencia de un sistema de evaluación simple, confiable y rápido que pueda ser usado para el *screening* de un gran número de muestras en simultáneo o *high-throughput screening* (HTS; Ashutosh *et al.*, 2005).

Los efectos citotóxicos de los compuestos sobre tripomastigotes en cultivos celulares o en modelos animales generalmente son evaluados por microscopía con macrófagos infectados, fijados y teñidos con Giemsa, o haciendo extendidos en

láminas (da Silva *et al.*, 2008). Ensayos de viabilidad celular como la prueba de reducción del MTT (Muelas-Serrano *et al.* 2000) y el resazurin (Rolon *et al.*, 2006) sólo han sido usados en epimastigotes y su interpretación es dificultosa siendo el tedioso recuento de parásitos la prueba de *screening* de elección. Aunque estas técnicas representan procedimientos estándar, no poseen una escala definida, requieren intenso trabajo, son costosas y toman tiempo analizarlas además de estar restringidas a ser usadas con muy pocos compuestos (de Castro *et al.*, 1994).

La tecnología de los genes reporteros está siendo usada para monitorear la proliferación y crecimiento celular de cultivos *in vitro* y, para monitorear los eventos celulares asociados a la expresión de genes. El uso de genes reporteros en varios organismos intracelulares como *Mycobacterium tuberculosis* (Williams *et al.*, 1999), *Leishmania donovani* (Ashutosh *et al.*, 2005), y *Toxoplasma gondii* (Seeber y Boothroyd, 1996) ha facilitado la evaluación y descubrimiento de drogas antimicrobianas, además de la cuantificación de infecciones en macrófagos y en modelos animales (Roy *et al.*, 2000; Hyland *et al.*, 2008).

La proteína verde fluorescente (GFP) insertada en promastigotes de *Leishmania* (Ha *et al.*, 1996) ha sido usada para el *screening* de productos naturales con actividad anti-leishmanial por citometría de flujo (Plock *et al.*, 2001). El ensayo no pudo ser aplicado como un sistema HTS debido a la baja fluorescencia detectada por el fluorómetro.

Buckner *et al.* (1996) desarrollaron un nuevo método de *screening* de drogas usando células de *T. cruzi* que expresen la β -galactosidasa de *Escherichia coli*. La actividad de esta enzima puede ser cuantificada en una placa de 96 pozos usando un lector de ELISA. A pesar de que el ensayo de β -galactosidasa se considera como un sistema HTS, no permite detectar menos de $1,25 \times 10^4$ parásitos ml^{-1} , se requiere entre 4 y 6 horas de incubación y ha sido desarrollada usando parásitos de una cepa sensible al benzonidazol y nifurtimox.

La luciferasa de la luciérnaga *Photinus pyralis* (Wet *et al.*, 1987) es una de las moléculas biológica reporteras más eficientes debido a que las pruebas de luminiscencia son de elevada sensibilidad (Gould y Subramani, 1988). El ensayo de *screening* de drogas usando células de *Leishmania* que expresen luciferasa ha podido detectar desde 10^2 parásitos ml^{-1} (Ashutosh *et al.*, 2005), puede ser cuantificada en una placa de 96 pozos usando un luminómetro y obtener resultados en menos de 5 min. En *T. cruzi*, la luciferasa sólo ha sido empleada para estudios de expresión de genes en forma transitoria (DaRocha *et al.*, 2004) o inducida (Taylor y Kelly, 2006) y para su expresión específica en el vector reduído (Thomas y González, 1997) pero ninguno de ellos ha reportado su uso para *screening*. Dada la carencia de drogas más efectivas para las diferentes fases clínicas de la enfermedad de Chagas se requiere desarrollar un método HTS más rápido y eficiente para la búsqueda de candidatos de drogas tripanosomicidas.

Por lo antes expuesto la **hipótesis** planteada fue: que la expresión constitutiva y estable del gen de la luciferasa en *T. cruzi* es posible como resultado de su recombinación en el genoma de este parásito. El **objetivo general** de la presente investigación fue desarrollar clones de *T. cruzi* que expresen constitutivamente el gen reportero de la luciferasa de luciérnaga. Los objetivos específicos fueron: 1) Construir un plásmido de expresión estable para *T. cruzi* que contenga el gen reportero de la luciferasa (*luc*), 2) Electroporar epimastigotes de *T. cruzi* con el plásmido *luc*-recombinante y clonarlos y 3) Evaluar la actividad de la luciferasa en los clones *luc*-transfectantes.

ANTECEDENTES

La Enfermedad de Chagas

Fue descubierta en 1909 por el médico Carlos Chagas en el estado de Minas Gerais (Brasil) quien identificó el parásito *Trypanosoma cruzi*, el agente etiológico de esta enfermedad. El reconocimiento a este científico se debe a que descubrió en un corto plazo una nueva especie, el vector trasmisor y la enfermedad que ahora lleva su nombre. Cien años después de ser descubierta, la enfermedad de Chagas continúa afectando a millones de personas.

La enfermedad de Chagas es un tema de salud pública a nivel mundial. Su impacto socio económico la hace la enfermedad parasitaria más importante de América. La tasa de infección en las áreas endémicas es estimado en 1,4% (OPS/OMS, 2005) con una variación geográfica de 0,1% a 45,2% (Schmunis y Cruz, 2005). En el hombre, la fase aguda de la enfermedad de Chagas empieza después de la infección y un subsecuente periodo de incubación. En ausencia de un tratamiento específico, los síntomas de esta fase persisten por alrededor de dos meses. La infección aguda también puede presentarse desapercibidamente con pocos síntomas. En la fase crónica, la mayoría de los pacientes adultos son asintomáticos, donde sólo alrededor del 20% de los casos desarrolla los síntomas clínicos característicos de esta fase como trastornos cardíacos, digestivos o neurológicos (de Castro *et al.*, 1993). Las drogas usadas para el tratamiento de esta enfermedad son el benzonidazol y el nifurtimox; sin embargo, ninguno ha demostrado erradicar la infección durante la fase crónica además de causar efectos secundarios en los pacientes (OMS, 2007).

En el Perú, la enfermedad de Chagas fue reportada por primera vez por el Dr. Edmundo Escomel en 1917 y dos años después se detectó el primer caso en un paciente procedente de Madre de Dios (Náquira y Cabrera, 2009). Actualmente se estima que podrían existir entre 650 000 y 680 000 infectados por *T. cruzi* y, de 5 a 6,5 millones de personas en riesgo de infección (OMS, 1991). La enfermedad de Chagas ha sido reportada principalmente en la región norte (Vargas Vásquez, 2005;

Vega *et al.*, 2005), sur (Bowman *et al.*, 2008) y más recientemente en la Amazonia peruana (Cabrera *et al.*, 2009; Solis *et al.*, 2009). Los síntomas clínicos de la enfermedad de Chagas dependen de la cepa presente en cada región (OMS, 2008). Las cepas de Arequipa y de Bolivia poseen diferencias clínicas y serológicas, pero la cepa boliviana parece ser más virulenta por el alto número de casos crónicos y agudos reportados (Gilman, comunicación personal).

Quimioterapia

Los blancos quimioterapéuticos en la enfermedad de Chagas son los tripomastigotes (forma sanguínea no-replicativa e invasora de tejidos) y los amastigotes (forma intracelular replicativa), retenidos con frecuencia en el músculo y difíciles de eliminar. Se ha observado *in vitro* e *in vivo* que la actividad de las drogas seleccionadas, incluyendo los compuestos usados clínicamente nifurtimox y benzonidazol, es diferente entre estadios y entre cepas de *T. cruzi* (Croft, 1986). Por otro lado, la transmisión de *T. cruzi* por transfusión sanguínea también requiere estudios *in vitro* para encontrar componentes activos contra tripomastigotes en sangre almacenada a 4°C. La violeta de genciana ha sido usada para esterilizar productos sanguíneos pero existen restricciones sobre su uso debido a su toxicidad contra los componentes sanguíneos. La actividad de las drogas a 4°C contra epimastigotes, no indica que estas sean activas contra tripomastigotes sanguíneos (Croft, 1986). Estos estudios han demostrado que las drogas son activas en un estadio pero no en otro, lo que confirma que los *screens in vitro* deben incluir los amastigotes intracelulares de las diferentes cepas de *T. cruzi* (Croft, 1986; Rodrigues Coura y de Castro, 2002).

Sistemas de *screening* de drogas

El método más comúnmente usado para el *screening* de drogas tripanosomicidas es el recuento microscópico de parásitos viables; sin embargo, demanda tiempo, es laborioso y carece de una escala definida, pues depende del observador (Berens *et al.*, 1982; Croft *et al.*, 1988; Chiari *et al.*, 1991; de Castro *et al.*, 1994, da Silva *et al.*, 2008). La búsqueda de drogas más efectivas ha involucrado de forma creciente el

uso de *screens in vitro* pues posee las siguientes ventajas: a) requerir pocos miligramos del compuesto a evaluar, b) analizar un gran número de muestras con resultados rápidos a bajo costo y c) requerir pocos animales experimentales. En los análisis quimioterapéuticos *in vitro* se usan modelos que involucran los estadios del ciclo biológico (Croft, 1986).

Ensayos colorimétricos *in vitro* sobre la viabilidad celular también han sido realizados en *T. cruzi*. El ensayo del MTT (Muelas-Serrano *et al.* 2000), el cual se basa en la reducción del MTT a formazan, es una técnica rápida y exacta pero requiere mucha atención en el diseño e interpretación de los resultados. Este método ha sido aplicado con epimastigotes y su sensibilidad llega a detectar alrededor de 5×10^5 parásitos ml^{-1} . Otro método usado para medir la citotoxicidad es el ensayo colorimétrico y cuantitativo usando la resazurina como indicador de oxido (azul)-reducción (rosado). Existe una correlación directa entre la reducción y la proliferación de organismos vivos, detecta desde 2.5×10^5 parásitos ml^{-1} , es barato, simple, es aplicado en epimastigotes y requiere 5 horas de incubación (Rolón *et al.*, 2006).

El uso de genes reporteros ha facilitado aun más el *screening* de drogas permitiendo analizar una gran cantidad de muestras en corto tiempo. Hasta la fecha el método más eficiente y con mayor aceptación es el desarrollado por Buckner *et al.* (1996). Este método se basa en el uso de parásitos modificados genéticamente para expresar la β -galactosidasa de *Escherichia coli*. Esta enzima es capaz de catalizar una reacción colorimétrica usando CPRG como sustrato. La actividad de la enzima en un pozo es proporcional al número de parásitos transfectados por pozo y puede ser medida usando un lector de ELISA. Detecta desde $1,25 \times 10^4$ parásitos ml^{-1} (2500 parásitos por pozo), es aplicado con tripomastigotes y requiere entre 4 y 6 horas de incubación.

La luciferasa de la luciérnaga ha sido usada para el *screening* de drogas de organismos intracelulares como *Mycobacterium tuberculosis* (Williams *et al.*, 1999), *Leishmania donovani* (Ashutosh *et al.*, 2005) y *Toxoplasma gondii* (Seeber y Boothroyd, 1996), pero aún no ha sido reportada para *T. cruzi*.

Expresión génica en Kinetoplástidos

La expresión génica en kinetoplástidos es muy diferente al de los eucariotes superiores. Siendo parte de un grupo que divergió tempranamente en la evolución, *T. cruzi* y otros miembros de la familia de los kinetoplástidos, presentan características peculiares respecto a los mecanismos que controlan la expresión génica tales como: transcripción policistrónica, procesamiento *trans-splicing* del mRNA, edición del RNA mitocondrial o transcripción de un grupo de genes que codifican proteínas por medio de la RNA polimerasa I (Clayton, 2002), convirtiéndolos en modelos de estudio interesantes.

La mayoría de genes son transcritos en pre- RNAs policistrónicos. Varias de las regiones codificantes del mRNA están separadas por regiones espaciadoras cortas que varían entre 100 y varios cientos de nucleótidos. Las moléculas de mRNA monocistrónicas maduras son generadas postranscripcionalmente desde estos precursores por dos reacciones de procesamiento del RNA: el *trans splicing* y la poliadenilación (Matthews *et al*, 1994; Hasting, 2005).

El *trans splicing* involucra un evento de unión entre dos moléculas precursoras: el *spliced leader* RNA y el preRNA (**Fig. 1**). El *splice leader* (SL) o miniexón es una molécula de RNA de 39 nucleótidos que es agregada al extremo 5' del mRNA. Los SL RNAs contienen un sitio *splice*-donador pero no aceptor, y una estructura 4'-cap hipermetilada modificada conteniendo el 7'-metil guanosina. El sitio aceptor del *splicing* es un dinucleótido AG del preRNA que precede el tracto de polipirimidinas ricas en uracilos. Los sitios de poliadenilación están localizados entre 100 y 300 nucleótidos *upstream* de la señal de *trans splicing* y la poliadenilación depende del *splicing downstream*. El *trans splicing* ocurre a través de dos reacciones de transesterificación análogo al *cis splicing* pero formando una estructura en forma de "Y" en vez de un lazo intermediario (Liang *et al.*, 2003).

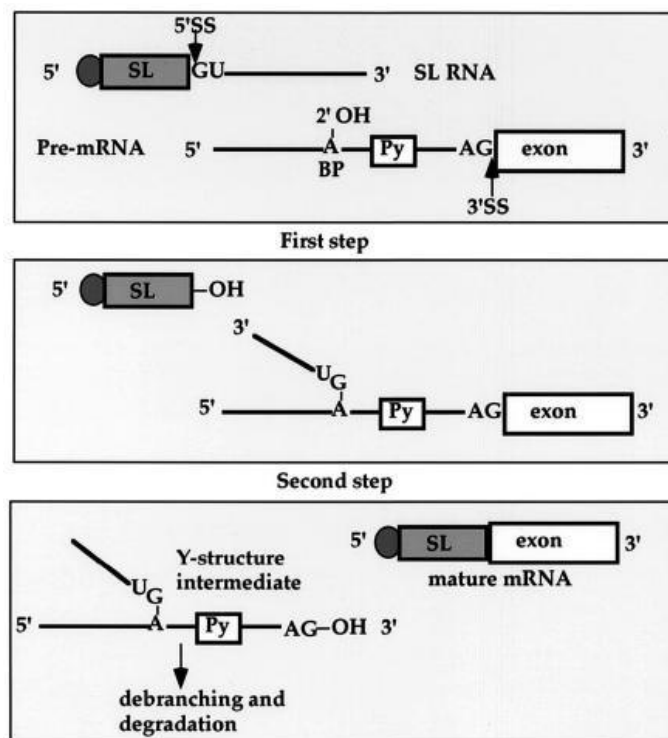


Figura 1. Representación esquemática del *trans splicing*. La figura muestra el sitio de corte 5' GU en el SL RNA y el sitio de corte 3' AG en el preRNA. BP, Punto de ramificación; Py, tracto de pirimidina (Liang *et al.*, 2003).

En kinetoplástidos, el SL *trans-splicing* tiene distintos roles en la función del mRNA que incluye: i) proveer la estructura 5' cap para los RNAs transcritos por la polimerasa del rRNA, Pol I (Lee & Van de Ploeg, 1997; Gunzl *et al.*, 2003); ii) resolver los transcritos policistrónicos sintetizados por la Pol II en mRNAs con cap individual y monocistrónico a través del SL *trans-splicing*, en sitios aceptores desparejados que están localizados río arriba de cada marco de lectura (Campbell *et al.*, 2003); y iii) mejorar la eficiencia traduccional del mRNA a través de la estructura cap modificada y/o la secuencia líder (Zeiner *et al.*, 2003).

La Transfección en *Trypanosoma cruzi*

Gracias al uso de la genética reversa es posible estudiar la biología de los tripanosomatidos. Los sistemas de transfección han sido desarrollados para generar mutantes *knockout*, genes reporteros, sondas y mutantes dominantes o recesivos. Los avances en la transfección y expresión de genes ha abierto la posibilidad de hacer análisis genéticos de estos parásitos. El primer reporte de transfección exitosa en *T. cruzi* fue logrado por Lu y Buck (1991) quienes construyeron un vector plasmídico conteniendo un segmento del miniexon y expresaron el gen bacteriano del clorafenicol acetil transferasa (CAT). Después de este primer reporte de transfección exitosa, se desarrolló un vector de clonación de múltiple propósito llamado pTEX (Kelly *et al.*, 1992). Este vector usa las secuencias de *splicing* y poliadenilación del gen del gliceraldehido fosfato deshidrogenasa (*gapdh*) para procesar un RNA exógeno y, el gen de resistencia a la neomicina. Una versión modificada del pTEX, incluyendo el promotor de RNA ribosomal (Tyler-Cross *et al.*, 1995), incrementó la expresión transitoria y mejoró los procedimientos de selección (Martinez-Calvillo *et al.*, 1997). La inclusión de una región intergénica (HX1) entre el promotor ribosomal y el gen reportero mejoró aun más la expresión al proveer un sitio aceptor más conveniente para el *trans splicing* (Vasquez y Levin, 1999) obteniéndose el vector pTRES.

La construcción de vectores de expresión también ha sido lograda en loci arreglados en *tándem* como el de la calmodulina-ubiquitina (CUB) 2.65 y 2.8 (Ajioka y Swindle, 1993) y la β -tubulina (Hyland *et al.*, 2008). Estos genes se expresan durante los estadios del ciclo de vida de *T. cruzi* (Chung *et al.*, 1990). Este tipo de arreglos ha facilitado la recombinación homóloga por integración del DNA circular (Hariharan *et al.*, 1993) o por reemplazo de genes (Chung *et al.*, 1994; Buckner *et al.*, 1996). Uno de los vectores que incluyó este locus fue el pB:PUB-Neo100 y fue el primero que se transfectó de forma estable y en forma circular (Hariharan *et al.*, 1993). Posteriormente, Chung *et al.* (1994) construyeron dos plásmidos, el pBS:BC-Neo10 y el pBS:F-CATSup4300, que al ser transfectados como DNA lineal permitieron analizar la expresión de los genes fusionados de calmodulina-ubiquitina a

través del reemplazo dual de genes en forma independiente y simultánea. La Flamme *et al.* (1996) lograron expresar la interleucina-2 (IL-2) usando un plásmido circular (pBS:IL-2-CnFc) y DNA linear (IL-2-Cn) que poseían regiones intergénicas del gen de la calmodulina A2 (Cal A2), el gen CUB 2.65 y el gen de fusión a la ubiquitina (FUS) . Ambos vectores produjeron transfectantes estables que secretaron IL-2. Buckner *et al.* (1996) construyeron el vector pBS:CL-Neo-01/BC-LacZ-10 conteniendo las regiones intergénicas del gen Cal B1 (CL y 01) y Cal A2 (BC y 10), este último para la expresión estable del gen de la β -galactosidasa de *Escherichia coli* (*lacZ*). El uso de este gen reportero permitió desarrollar un nuevo método de *screening* de drogas anti- *T. cruzi*.

Cabe resaltar que todos los plásmidos descritos llevaron el gen de la neomicina fosfotransferasa II (*neo*) que confiere resistencia al antibiótico G418. El mejoramiento de vectores y protocolos de electroporación (DaRocha *et al.*, 2004) para poder transfectar y expresar de forma transitoria y estable genes de interés, ha permitido mejorar la comprensión de la expresión de genes de kinetopláستidos pero los estudios de transfección estable aún necesitan ser explorados.

Mecanismos de introducción del DNA

Los transformantes estables son generalmente obtenidos por recombinación homóloga del DNA de interés junto a un gen marcador de selección dominante en el locus blanco. De esta forma los genes pueden ser alterados o eliminados, los niveles de expresión cambiados y los transgenes pueden ser introducidos.

En *T. cruzi* se han descrito algunos mecanismos de introducción de DNA. Después de la electroporación de DNA circular y la selección para una expresión estable, el DNA puede ser mantenido extra cromosómicamente como episoma o podría integrarse en el genoma del parásito (Kelly *et al.*, 1992; Bellofatto *et al.*, 1991; Hariharan *et al.*, 1993; Martínez-Calvillo *et al.*, 1997; Vasquez y Levin, 1999; Lorenzi *et al.*, 2003; Ashutosh *et al.*, 2005). Al contrario, después de la transfección de los constructos como DNA linear y selección para expresión estable, los elementos lineares se integran en sitios homólogos causando el reemplazo de genes (ten

Asbroek *et al.*, 1993, Chung *et al.*, 1994; Buckner *et al.* 1996; Thomas y González, 1997; DaRocha *et al.*, 2004; Burkard *et al.* 2007, Hyland *et al.*, 2008).

Principios de la electroporación

La electroporación es un método de transfección que permite la transferencia de ácidos nucleicos al interior de una célula mediante la aplicación de pulsos eléctricos de alto voltaje y corta duración, lo cual crea poros temporales en la membrana de las células. Estos poros son suficientemente grandes para permitir la difusión de las macromoléculas. Al detener el campo eléctrico y luego de un periodo de incubación, estos poros son resellados y el material genético se encuentra listo para ser transcrito.

La luciferasa y la bioquímica de la luminiscencia

La luciferasa de la luciérnaga es la molécula más usada de todos los reporteros bioluminiscentes debido a que su actividad enzimática está muy acoplada a la síntesis de proteínas y a que los ensayos de luminiscencia son rápidos y sensibles. Esta enzima monomérica de 61 kD cataliza una reacción de oxidación para producir luz entre la región del color verde y amarillo (550 – 570 nm) (Wood, 1995).

La generación de luz requiere la activación de la luciferina por una reacción enzimática que incluye el corte del pirofosfato del ATP para formar el adenilato de luciferil. En presencia del oxígeno molecular y de la luciferasa, la luciferina pasa por múltiples descarboxilaciones oxidativas para formar la oxiluciferina. Este proceso es acompañado de la emisión de luz. La luciferina es regenerada a partir de la oxiluciferina en una serie de reacciones subsecuentes (Nelson y Cox, 2005).

MATERIAL Y MÉTODOS

El desarrollo de la presente tesis se llevó a cabo en las instalaciones del Laboratorio de Enfermedades Infecciosas, Facultad de Ciencias y Filosofía, Universidad Peruana Cayetano Heredia.

Cepas y cultivos de *Trypanosoma cruzi*

La cepa DH29 fue proporcionada por el Dr. Carlos Lafuente (Hospital Universitario Japonés, Santa Cruz, Bolivia). La cepa fue aislada de un niño que adquirió la enfermedad Chagas por infección congénita y que fue diagnosticado por observación directa del parásito. Esta cepa fue recuperada haciendo un cultivo celular con la sangre del paciente. La cepa referencial Tulahuen clon C4 fue donada por el Dr. Frederik Buckner (Departamento de Medicina, Universidad de Washington). Esta cepa tiene insertado, de forma estable, el gen de la β -galactosidasa (*lacZ*) de *Escherichia coli*.

Los epimastigotes fueron cultivados a 28 °C en medio LIT suplementado con FBS al 10% (Camargo, 1964) más penicilina (100 UI ml⁻¹) y gentamicina (40 µg ml⁻¹). Los cultivos de epimastigotes transfectantes en fase estacionaria, conteniendo tripomastigotes metacíclicos diferenciados, fueron usados para infectar células Vero a partir de las cuales, los tripomastigotes se mantuvieron por pasajes continuos. Los cultivos celulares fueron mantenidos a 37 °C en medio RPMI suplementado con FBS al 10% (Kelly *et al.*, 1992).

Construcción de plásmidos

La construcción requirió el uso de dos vectores reportados para expresión estable en *T. cruzi*: el pBS:CL-Neo-01/BC-LacZ-10 (Buckner *et al.*, 1996) y el pTREX (Vasquez y Levin, 1999). Los siguientes métodos fueron desarrollados siguiendo los protocolos descritos por los fabricantes de las enzimas usadas: corte del DNA con enzimas de restricción, desfosforilación del DNA con fosfatasa alcalina y ligación de los fragmentos de DNA.

El primer plásmido de expresión fue construido en base al vector pBS:CL-Neo-01/BC-LacZ-10 (pLAC; **Fig. 2A**) donado por el Dr. Frederik Buckner. Brevemente, el ORF de la luciferasa (*luc*) fue amplificado por PCR con la enzima *Pfu* polimerasa a partir del plásmido pGEM-Luc (Promega) y usando los *primers* LucBamHI-F y LucBamHI-R (**Tabla 1**) los cuales incluyeron sitios de restricción para la enzima *Bam*HI. Las condiciones de amplificación fueron: denaturación a 96 °C por 30 seg, hibridación (*T_m*) a 50 °C por 30 seg y extensión a 72 °C por 2 min. El producto amplificado (1,7 Kb) fue visualizado en un gel de agarosa al 1% y purificado con el QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) siguiendo los protocolos del fabricante. El ORF de la β -galactosidasa insertado en el pLAC fue extraído con *Bam*HI obteniéndose el pBS:CL-Neo-01/BC-X-10. El fragmento *Bam*HI, representando el ORF de *luc*, fue ligado en el sitio *Bam*HI del vector linearizado y desfosforilado pBS:CL-Neo-01/BC-X-10 para producir el plásmido pBS:CL-Neo-01/BC-Luc-10 (pBS-Neo-Luc).

El segundo plásmido de expresión fue construido usando el vector pTREX (**Fig. 2B**) donado por el Dr. Mariano Levin (Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular, Universidad de Buenos Aires). Brevemente, el ORF de *luc* fue amplificado por PCR bajo las condiciones antes descritas pero usando los *primers* LucHindIII y LucXhoI (**Tabla 1**) los cuales incluyeron sitios de restricción para las enzimas *Hind*III y *Xho*I. El producto amplificado *Hind*III y *Xho*I representando el ORF de *luc* fue ligado en el vector linearizado pTREX para producir el plásmido pR-Luc-Neo.

Las células competentes de *E. coli* NovaBlue (Novagen) fueron transformadas con los productos de ligación (pBS-Neo-Luc y pR-Luc-Neo) y seleccionadas por resistencia a carbenisilina (100 μ g/ml) en placas de agar LB. Las colonias obtenidas fueron repicadas en medio LB con carbenisilina (100 μ g ml⁻¹). Mientras los cultivos crecían se comprobó por PCR si el gen *luc* estaba insertado en los plásmidos recombinantes. La purificación de los plásmidos *luc*-recombinantes por el método del fenol-cloroformo (Sambrook *et al.*, 1989) sólo fue hecha a partir de los cultivos que amplificaron la luciferasa.

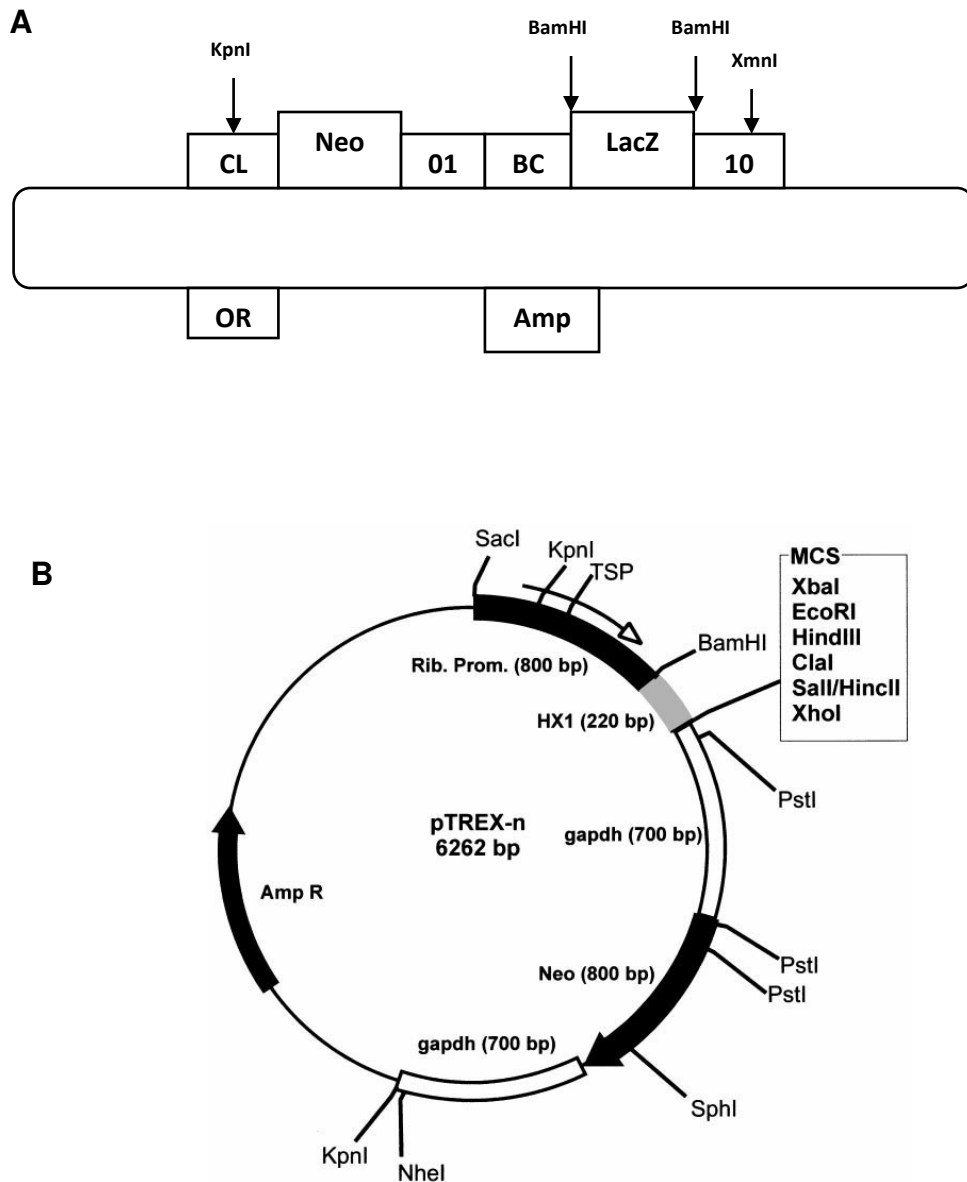


Figura 2. Vectores usados para la expresión estable de la luciferasa. (A) Plásmido pBS:CL-Neo-01/BC-LacZ-10. Las regiones intergénicas del locus 2.65 de la calmodulina-ubiquitina rodean el gen *neo* y el gen *lacZ*. (B) Plásmido pTREX. Las regiones intergénicas del gen *gapdh* rodean el gen *neo*. También se muestra el promotor del RNA ribosómico, la región intergénica HX1 que contiene la señal *trans-splicing* y un sitio de clonamiento múltiple.

La orientación correcta del gen *luc* en sentido 5'→ 3' insertado en el plásmido de expresión pBS-Neo-Luc se determinó por PCR usando un *primer* del vector pLACseq-F y uno del inserto Lucseq-R1 (**Tabla 1**; Tm=60 °C). El inserto en sentido 5'→ 3' muestra un producto de amplificación de 729 pb.

Secuenciación y diseño de *primers*

Para comprobar si la secuencia del ORF de la luciferasa estaba completa e insertada en el sentido correcto y, para detectar la presencia de cualquier delección, adición o mutación puntual que podría haber aparecido durante la amplificación del gen, los dos plásmidos recombinantes se secuenciaron en ambos sentidos. Para ello se diseñaron 6 *primers*: 4 dentro del inserto y 2 externos correspondientes al vector (**Tabla 1**) de tal forma que los segmentos secuenciados se solaparon aproximadamente 100 pb. También se usaron los *primers* que amplificaron la luciferasa para los dos vectores construidos. Las estructuras secundarias de cada *primer* que podrían afectar el secuenciamiento se analizaron usando el programa *Gene Runner* (versión 3.05). Un clon del plásmido pBS-Neo-Luc (B36) y 3 clones del plásmido pR-Luc-Neo (H5, H11 y H14) fueron secuenciados. La secuenciación estuvo a cargo de la compañía MacroGen Inc. (Corea) con los volúmenes y concentraciones sugeridos por ellos. Las secuencias reportadas fueron analizadas con el programa SeqMan II (versión 5.05) para el ensamblaje y la obtención de la secuencia consenso.

Electroporación

La transfección se hizo según el protocolo de Hariharan *et al.* (1993) con algunas modificaciones. Brevemente, epimastigotes en fase media-logarítmica fueron cosechados por centrifugación a 3000 g por 10 min, lavados una vez en *buffer* de electroporación (PBS, MgCl₂ 0.5 mM, CaCl₂ 0.1 mM), resuspendidos en 100 µl del mismo *buffer* a una concentración de aproximadamente 10⁹ células ml⁻¹ e incubados en hielo por 10 min en cubetas de electroporación (*gap* de 0.2 cm).

Tabla 1. Secuencia de todos los oligonucleótidos usados en la construcción y/o análisis de los plásmidos y clones descritos en esta tesis.

Nombre	Secuencia	Descripción	Autor
Luc BamHI-F	5'cgcGGATCC ATG GAA GAC GCC AAA AAC-3'	Nucleótidos del 1-18 del ORF de <i>luc</i> , sitio BamHI (delineado)	Núñez-Zapata <i>et al.</i> (2009)
Luc BamHI-R	5'cgcGGATCC TTA CAA TTT GGA CTT TCC GCC-3'	Primer reverso, nucleótidos del 1653-1632 del ORF de <i>luc</i> , sitio BamHI (delineado)	Núñez-Zapata <i>et al.</i> (2009)
Luc HindIII	5'cccAAGCTT ATG GAA GAC GCC AAA AAC-3'	Nucleótidos del 1-18 del ORF de <i>luc</i> , sitio HindIII (delineado)	Núñez-Zapata <i>et al.</i> (2009)
Luc XhoI	5'ccgCTCGAG TTA CAA TTT GGA CTT TCC GCC-3'	Primer reverso, nucleótidos del 1653-1632 del ORF de <i>luc</i> , sitio XhoI (delineado)	Núñez-Zapata <i>et al.</i> (2009)
pLAC seq-F	5' CCA ACA ACA AGA AGA ACA C 3'	Nucleótidos del 397- 416 del fragmento “BC” de la calmodulina A2 de <i>T. cruzi</i>	Núñez-Zapata <i>et al.</i> (2009)
pLACseq-R	5'TCC TTT GGT TTT CCC TCC 3'	Primer reverso, nucleótidos del 1004-986 del fragmento “10” de la calmodulina A2 de <i>T. cruzi</i>	Núñez-Zapata <i>et al.</i> (2009)
Lucseq-F1	5'CCT CCC GGT TTT AAT GAA TAC G 3'	Nucleótidos del 517- 539 del ORF de <i>luc</i>	Núñez-Zapata <i>et al.</i> (2009)
Lucseq-F2	5' GCT ATT CTG ATT ACA CCC GAG G 3'	Nucleótidos del 1041-1063 del ORF de <i>luc</i>	Núñez-Zapata <i>et al.</i> (2009)
Lucseq-R1	5' CTG ACG CAG GCA GTT CTA TGC 3'	Primer reverso, nucleótidos del 653-632 del ORF de <i>luc</i>	Núñez-Zapata <i>et al.</i> (2009)
Lucseq-R2	5' CAG ATC CAC AAC CTT CGC TTC 3'	Primer reverso, nucleótidos del 1128-1107 del ORF de <i>luc</i>	Núñez-Zapata <i>et al.</i> (2009)
Neo-1	5'ATG ATT GAA CAA GAT GGA TTG 3'	Nucleótidos del 1-21del ORF de <i>neo</i>	Hariharan <i>et al.</i> (1993)
Neo-2	5' TCA GAA GAA CTC GTC AAG 3	Primer reverso, nucleótidos 795-778 del ORF de <i>neo</i>	Hariharan <i>et al.</i> (1993)

Luego se agregó 100 µg de DNA circular de ambos plásmidos recombinantes a 70 µl de la suspensión celular y se incubó por 5 min en hielo. Las células fueron transfectadas con un electroporador (Eppendorf) con dos pulsos de 1000 V cada uno y con tiempos constantes entre 1,2 y 1,4 ms. Las células electroporadas fueron resuspendidas en 10 ml de medio LIT e incubadas a 28°C. Los parásitos no transfectados de la cepa DH29 fueron usados como controles negativos. El plásmido pLAC, conteniendo el gen reportero de la β-galactosidasa (Buckner *et al.*, 1996), fue usado como control del sistema de electroporación.

Clonamiento y Selección de parásitos

Para la obtención de clones *luc* y *neo* transfectantes se siguió el protocolo descrito por Hariharan *et al.* (1993). Los parásitos fueron seleccionados en presencia de G418 (500 µg ml⁻¹) el cual fue agregado 48 horas después de la electroporación. Los parásitos que crecieron en el medio selectivo fueron aislados por diluciones limitantes. Brevemente, se hizo un recuento de parásitos en una cámara de Neubauer, la solución de parásitos transfectantes se diluyó hasta una concentración de 5 parásitos ml⁻¹, y el cultivo se distribuyó en placas de 96 pozos en un volumen final de 200 µl, obteniéndose aproximadamente 1 parásito por pozo. La selección de parásitos *neo* y *luc*- transfectantes se hizo por PCR. El gen *neo* se amplificó según las condiciones descritas por Hariharan *et al.* (1993).

Los epimastigotes transfectantes se mantuvieron repicándolos cada 15 días en medio selectivo (G418 500 µg ml⁻¹). Los tripomastigotes metacíclicos, diferenciados a partir del cultivo de epimastigotes transfectantes en fase estacionaria, fueron usados para infectar monocapas de células Vero a partir de las cuales los tripomastigotes pudieron ser mantenidos por pasajes continuos.

Análisis por Western Blot

La evaluación de la expresión de la luciferasa se hizo según el protocolo de Boucher *et al.* (2002) con algunas modificaciones. Para preparar lisados de proteínas solubles, los epimastigotes transfectantes fueron cosechados por centrifugación, lavados con PBS y resuspendidos en *buffer* de lisis (úrea 8 M,

CHAPS al 4%, Tris base 40 mM). El extracto total de proteínas (30 µl) fue separado por electroforesis en SDS-PAGE al 10%.

Las proteínas fueron transferidas sobre una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad) y bloqueadas por 1 hora con leche semidescremada (Nestle) al 5%, disuelto en PBST (PBS, Tween 20 al 0.1%). El anticuerpo primario anti- luciferasa producido en cabra (Promega), diluido a 1:2000 en PBST con leche semidescremada al 1%, fue incubado por 90 min en agitación. Después de 3 lavados con PBST, la membrana fue incubada por 60 min con el anticuerpo secundario anti- IgG de cabra, producido en conejo, conjugado a la peroxidasa (KPL Laboratories) diluido a 1:5000 en PBST con leche semidescremada al 1%. La proteína fue visualizada con DAB y peróxido de hidrógeno.

Prueba de la actividad de la luciferasa

Para evaluar la actividad de la luciferasa (Ashutosh *et al.*, 2005) en los parásitos transfectados, los epimastigotes fueron cosechados por centrifugación, lavados una vez y resuspendidos en medio RPMI sin rojo de fenol. Una alícuota de 50 µl de la suspensión de parásitos fue mezclada con 50 µl de Steady-Glo reagent siguiendo el protocolo del fabricante (Promega) y leída en un luminómetro manual (Berthold) como unidades relativas de luz (RLUs). Los tripomastigotes derivados del cultivo celular fueron cosechados del sobrenadante y evaluados de la misma forma que los epimastigotes.

Prueba de la actividad de la β -galactosidasa

Para evaluar la actividad de la β -galactosidasa (Buckner *et al.*, 1996) los epimastigotes o tripomastigotes transfectados fueron lavados una vez, resuspendidos en medio RPMI sin rojo de fenol y lisados con Nonidet P-40 al 0.1% disuelto en PBS (pH 7,4) en presencia de CPRG 100 µM. La suspensión de parásitos se tornó de color amarillo a rojo en pocos minutos en los clones positivos. Para medir la actividad de la β -galactosidasa, en una placa de 96 pozos se mezcló 200 µl de la suspensión de parásitos con 25 µl de la solución de CPRG y Nonidet P-40, se incubó por 5 horas a 37°C y se leyó a 570 nm en un lector de ELISA.

RESULTADOS

Construcción de los vectores de expresión del gen de la luciferasa

Se construyeron dos plásmidos para la expresión estable de la luciferasa: pBS-Neo-Luc y pR-Luc-Neo. En el primer caso, el gen *lacZ* contenido en el plásmido pBS:CL-Neo-01/BC-LacZ-10 (pLAC) fue reemplazado por la secuencia codificante de la luciferasa (*luc*) usando una enzima de restricción (*Bam*HI). El análisis por PCR de las colonias que insertaron el gen *luc* (n=6), permitió identificar la única colonia conteniendo el inserto en sentido 5'→3' (**Fig. 3**). En el caso del pR-Luc-Neo, el gen *luc* fue directamente clonado en la orientación correcta en el sitio de clonamiento múltiple luego de digerir al vector pTREX con dos enzimas (*Hind*III y *Xho*I). Los plásmidos de las colonias que insertaron el gen *luc* en sentido 5'→3' fueron secuenciados y las secuencias reportadas fueron ensambladas (**Fig. 4**). El análisis de BLASTN entre la secuencia consenso de los plásmidos analizados y la secuencia del pGEM-Luc (GenBank: X52096) mostró una identidad del 100% (**Fig 5**), indicando que la secuencia del gen *luc* insertado no fue alterada.

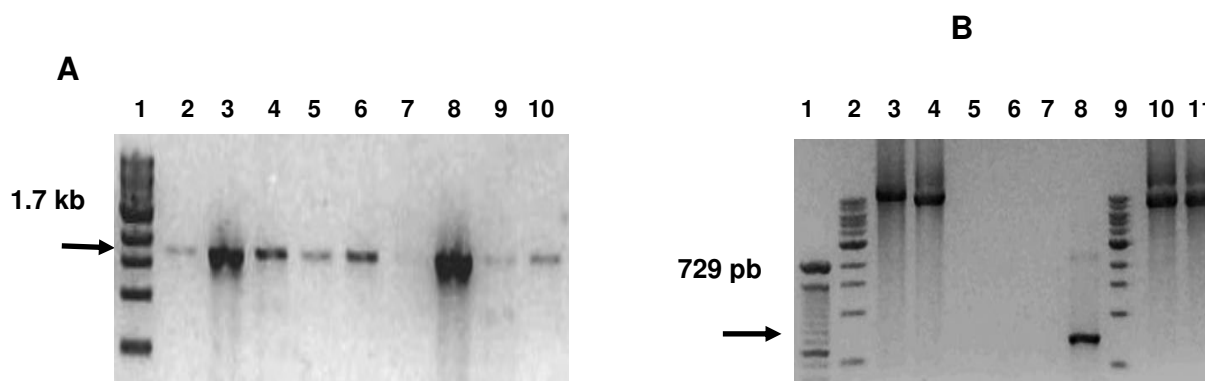


Figura 3. PCR de colonias de *E. coli* Novablue transformadas con pBS-Neo-Luc. (A) Colonias que insertaron el gen *luc* (carril 3 y 8); Marcador de peso molecular (MPM) de 1kb. (B) Colonia insertada en sentido 5'→3' (carril 8); MPM de 100 pb (carril 1); MPM de 1 kb (carril 2 y 9).



Figura 4. Secuenciación de los plásmidos pBS-Neo-Luc (clon B36) y pR-Luc-Neo (clones H5, H11 y H14). (A) Mapa de localización de los *primers* de secuenciación. (B) Cromatogramas mostrando el ensamblaje de las secuencias producidas por los *primers* LucHindIII/LucBamHI y LucseqR1, indicadas en (A) con flechas de color azul.

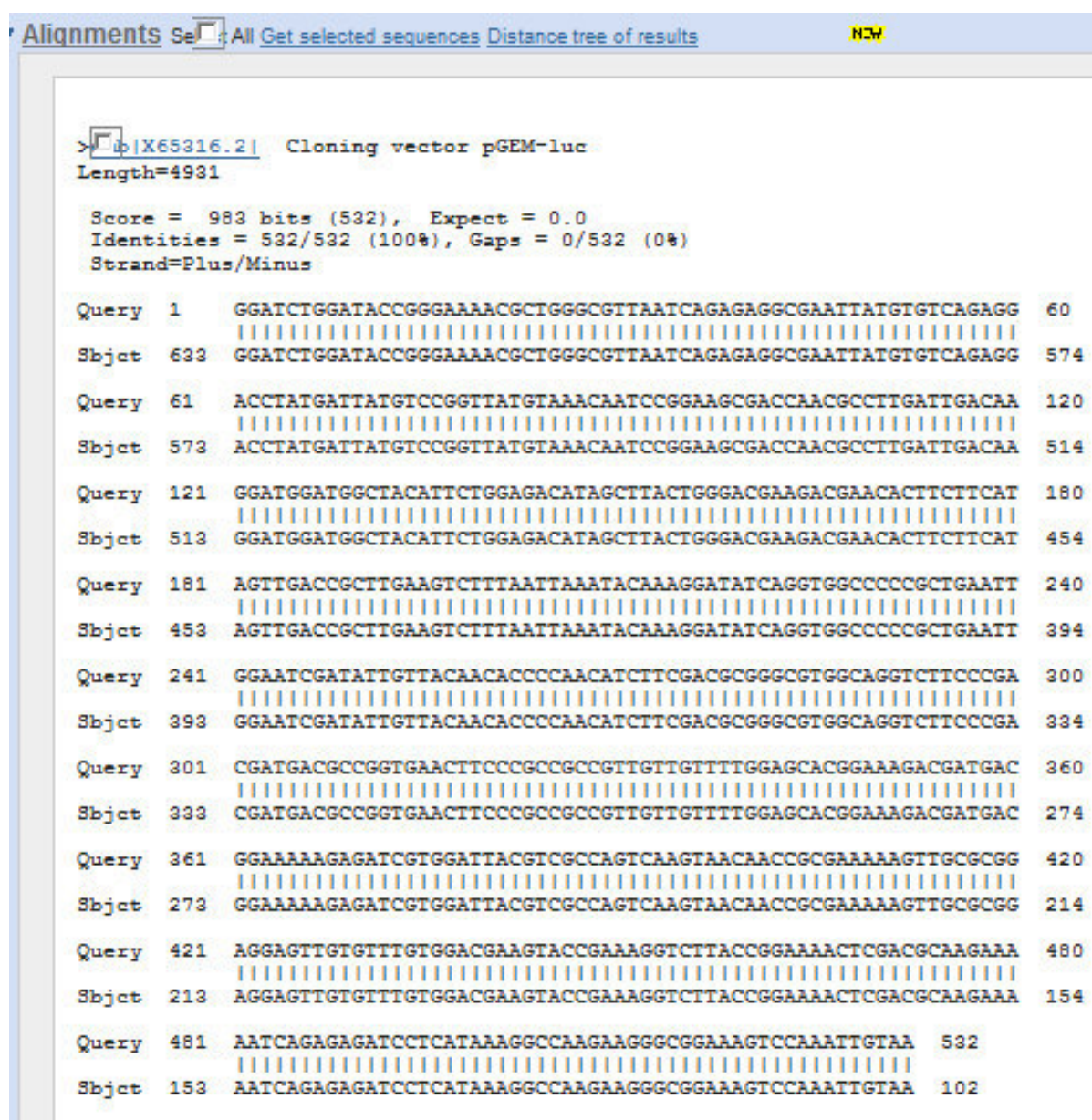


Figura 5. Alineamiento de un segmento de la secuencia del gen de la luciferasa insertado en el plásmido pBS-Neo-Luc (clon B36) con su secuencia original.

Obtención de parásitos transfectantes

Después de la electroporación los parásitos transfectados con los plásmidos *luc*-recombinantes pBS-Neo-Luc y pR-Luc-Neo, además del plásmido pLAC, produjeron líneas celulares resistentes al antibiótico G418 ($500 \mu\text{g ml}^{-1}$) los cuales fueron seleccionados entre la tercera y la cuarta semana. Los parásitos electroporados sin los plásmidos, murieron. Los parásitos *neo*^r fueron clonados por diluciones limitantes. Los cultivos de los clones *neo*^r fueron mantenidos en medio LIT en presencia de G418 ($500 \mu\text{g ml}^{-1}$).

La transfección del gen *luc* y del gen *neo* fue verificada inicialmente por PCR extrayendo el DNA de los parásitos resistentes a G418. Todos los clones analizados tenían el gen *neo* y de ellos sólo algunos tenían el gen *luc* (**Fig. 6**) por lo que sólo los clones que conservaron ambos genes continuaron cultivándose. De los parásitos transfectados con pBS-Neo-Luc y pR-Luc-Neo se aislaron los clones L95 y L97, respectivamente. De los transfectados con pLAC, se aisló el clon L24 luego de verificar que la enzima β -galactosidasa transfectada tenía actividad.

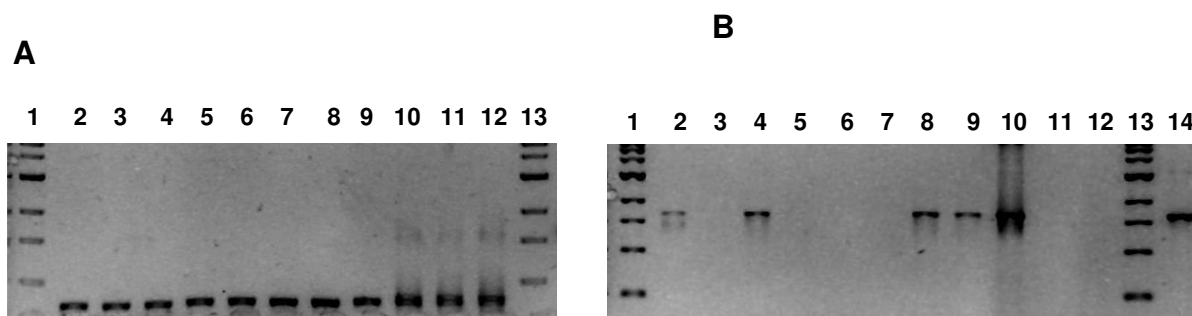


Figura 6. Selección de clones de *T. cruzi* transfectantes por PCR. (A) Clones que insertaron el gen *neo* (carril 2-9). (B) Clones que insertaron el gen *luc* (carril 4, 8 y 9). MPM de 1Kb (En A y B, carril 1 y 13); control positivo de luciferasa (B, carril 10).

Expresión de los genes de luciferasa y β -galactosidasa

La expresión del gen de la luciferasa fue evaluada después del segundo subcultivo por medio de un análisis por *western blot*. El análisis del extracto total de proteínas de los parásitos transfectantes, empleando un anticuerpo anti-luciferasa reveló una banda de 61kD correspondiente a la luciferasa. Esta banda no se observó en los parásitos no transfectados de la cepa DH29 (**Fig. 7**). Esta enzima sólo pudo ser detectada como antígeno lineal en condiciones denaturantes usando DTT.

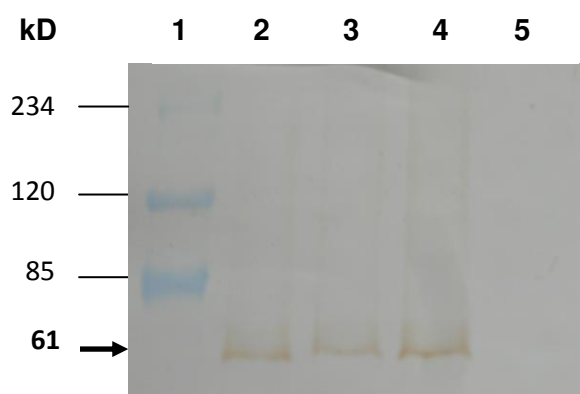


Figura 7. Análisis por *western blot* mostrando la proteína luciferasa (flecha) en parásitos de *T. cruzi* transfectados con los plásmidos *luc*-recombinantes. Clon L95 (carril 2), clon L96 (carril 3), clon L97 (carril 4), cepa DH29 no transfectada (carril 5).

La actividad de la luciferasa fue evaluada en los parásitos transfectados con los plásmidos pBS-Neo-Luc y pR-Luc-Neo y que expresaron el gen *luc*, observándose una excelente correlación entre el número de epimastigotes transgénicos y la actividad de la luciferasa. La correlación (r^2) obtenida por el clon L95 (0,9994) fue similar al obtenido por el clon L97 (0,9997). La prueba de la actividad de la luciferasa demostró una elevada sensibilidad pudiendo detectarse desde 10 epimastigotes por tubo (10^2 parásitos ml^{-1}) (**Fig. 8**). La actividad de la luciferasa no se detectó en los parásitos no transfectados (wt).

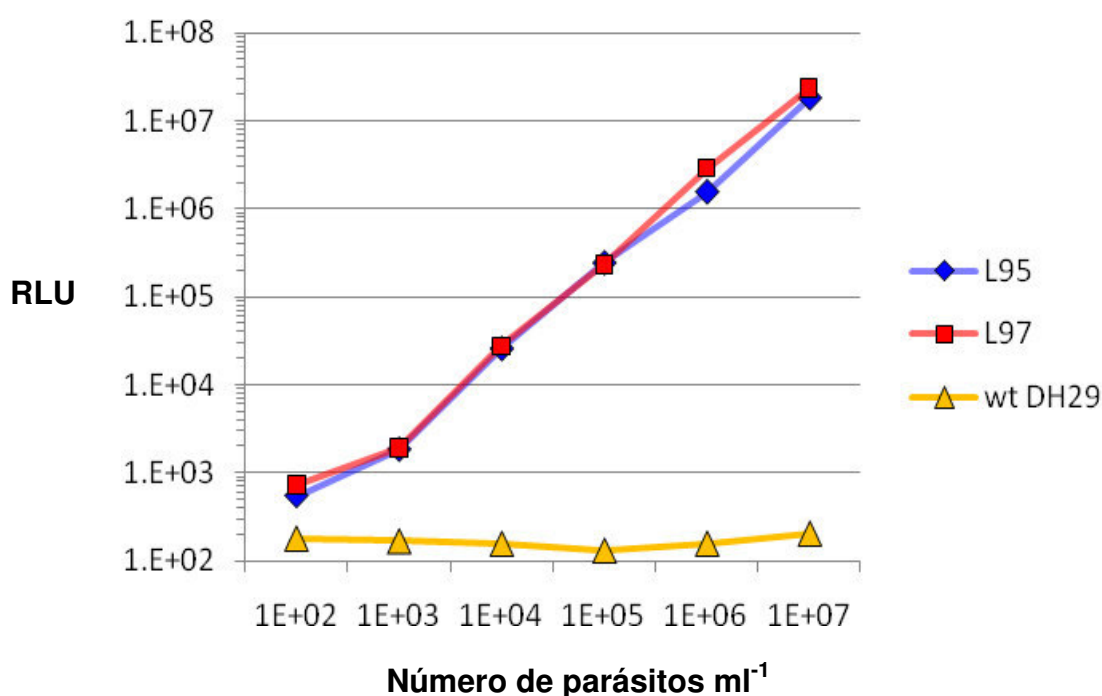


Figura 8. Correlación entre la actividad de la luciferasa (RLU) y el número de epimastigotes por ml transfectados con pBS-Neo-Luc (L95) y pR-Luc-Neo (L97).

La expresión de la β -galactosidasa por los parásitos transfectados con el plásmido pLAC fue evaluada midiendo la actividad. Al realizar la prueba de la actividad de la β -galactosidasa en los parásitos del clon L24, se pudo detectar desde 200 parásitos por pozo (10^3 parásitos ml^{-1}) (**Fig. 9**) pero con una correlación inferior ($r^2 = 0,8153$) al obtenido por el clon C4 ($r^2 = 0,9849$).

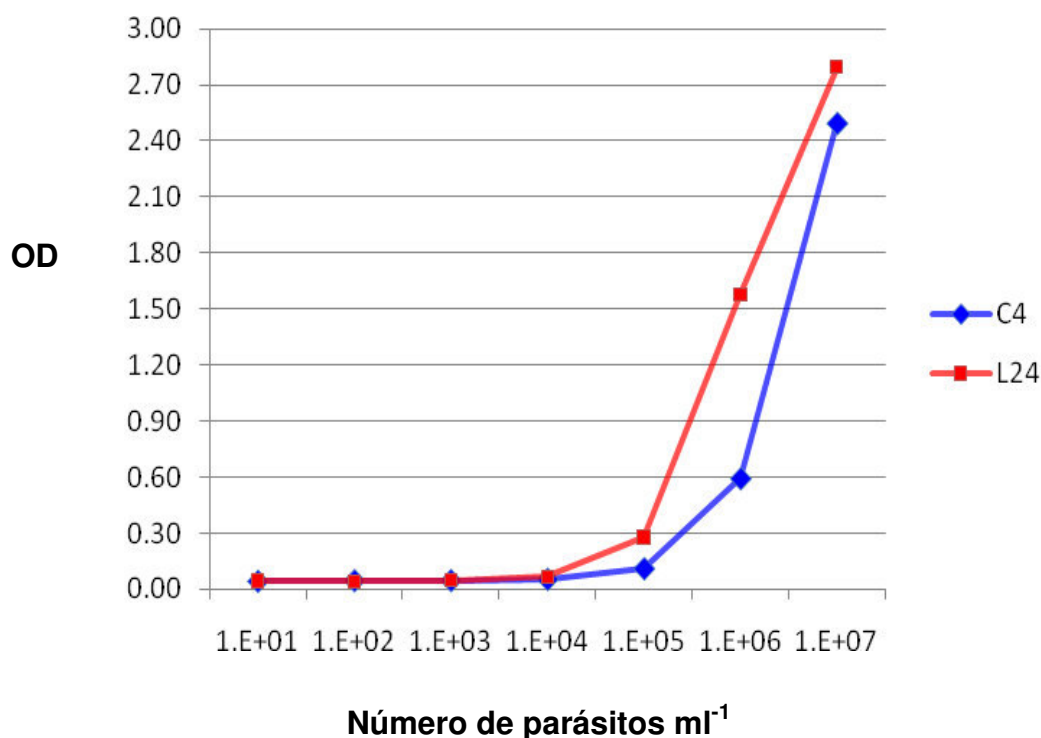


Figura 9. Sensibilidad de la prueba de la actividad de la β -galactosidasa (OD) en parásitos de la cepa Tulahuen, clon C4 y la cepa DH29, clon L24.

Estabilidad de los genes reporteros

La estabilidad de los genes de la luciferasa y β -galactosidasa se midió en el tiempo y en cada estadio de *T. cruzi*. Los cultivos de los clones *neo^r* fueron mantenidos en medio LIT en presencia de G418 ($500 \mu\text{g ml}^{-1}$) por 3 meses, luego éste fue retirado. La estabilidad de la resistencia a G418 se mantuvo por más de seis meses en ausencia de la selección. La adición de G418 ($500 \mu\text{g ml}^{-1}$) sólo inhibió el crecimiento de los parásitos no transfectados, careciendo de efecto sobre los parásitos resistentes a G418 indicando que fueron establemente transfectados (**Fig. 10**). Por otro lado, la actividad de la luciferasa y de la β -galactosidasa pudo ser detectada en tripomastigotes obtenidos a partir de la infección de monocapas de células Vero, lo cual indica que la expresión de ambos genes se mantuvo en todos los estadios de *T. cruzi*.

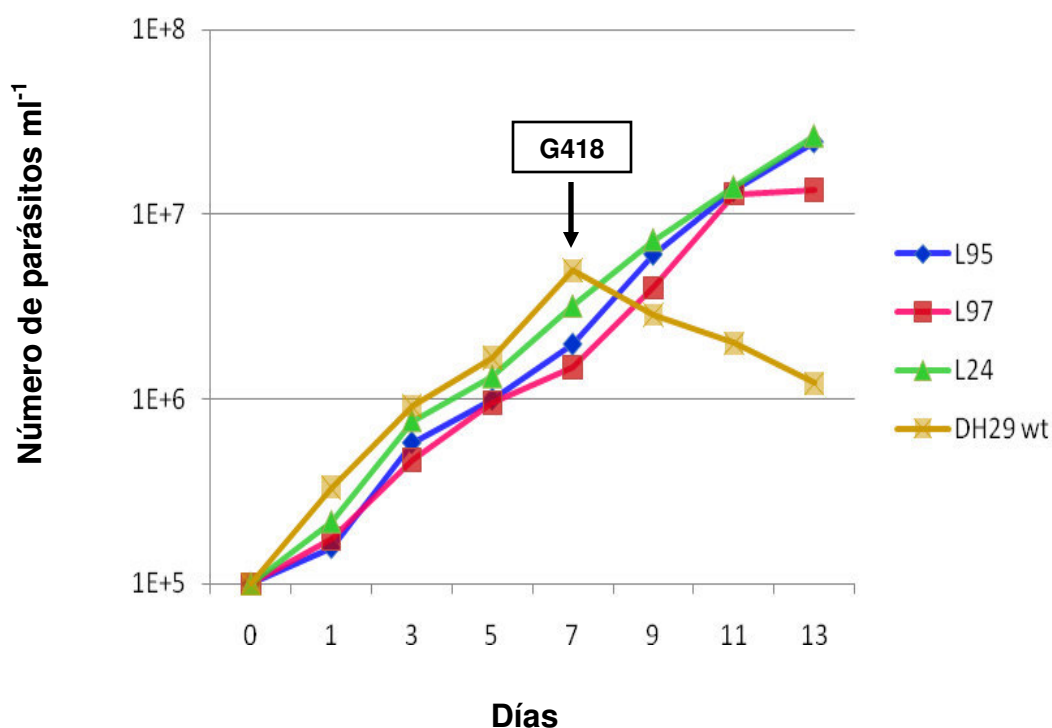


Figura 10. Efecto del antibiótico G418 sobre el crecimiento de epimastigotes de la cepa DH29 y los clones L95, L97 y L24 transfectados establemente.

DISCUSION

En la presente tesis se describe la transfección estable de la luciferasa de la luciérnaga, además de la β -galactosidasa de *E. coli*, en epimastigotes de *T. cruzi*, de la cepa DH29 de origen boliviano. Para lograr este objetivo se usaron dos vectores plasmídicos que generaron clones integrados por recombinación homóloga en secuencias blanco diferentes.

Construcción de plásmidos recombinantes para *T. cruzi*

El desarrollo de parásitos transfectantes se logró usando dos plásmidos de expresión estable para *T. cruzi*: pBS:CL-Neo-01/BC-LacZ-10 (pLAC; Buckner *et al.*, 1996) y pTREX (Vasquez y Levin, 1999). El pLAC fue elegido por expresar de forma estable del gen de la β -galactosidasa de *E. coli* en *T. cruzi* (Buckner *et al.*, 1996). El desarrollo del clon C4 que expresa este gen ha sido usado desde entonces en el *screening* de drogas contra este parásito. El pTREX fue elegido por poseer secuencias UTRs que han demostrado mejorar la expresión de genes reporteros significativamente (Vasquez y Levin, 1999). Ambos vectores también poseen el gen de resistencia al antibiótico G418 (*neo*) y han sido descritos como vectores de expresión estable para *T. cruzi*.

El mecanismo de integración de ambos plásmidos ha sido descrito. Los dos vectores se integran al DNA por recombinación homóloga en loci altamente conservados pero en diferentes regiones, pLAC se recombina por reemplazo de genes en *tándem* en el locus 2.65 de la calmodulina-ubiquitina (Ajioka y Swindle, 1993; La Flamme *et al.*, 1996) y pTREX, por integración del plásmido en el locus ribosomal (Martínez-Calvillo *et al.*, 1997; Vasquez y Levin, 1999; Lorenzi *et al.*, 2003).

Para la construcción del vector de expresión de la luciferasa pBS-Neo-Luc, el gen *lacZ* obtenido por digestión con *Bam*HI, fue reemplazado por el gen *luc*. El uso de una sola enzima de restricción induce a que el inserto pueda ser incorporado en sentido 5'→3' ó 3'→5' dificultando la selección de las colonias transformantes. Pero métodos como el PCR y el secuenciamiento fueron herramientas que facilitaron la

identificación de los transformantes correctamente insertados. A diferencia de este vector, la construcción del vector pR-Luc-Neo sólo requirió que el pTREX fuera digerido con dos enzimas de restricción diferentes que permitieron la inserción del gen *luc* sólo en sentido 5'→3'.

Condiciones óptimas de electroporación para la transfección

Muchos de los conocimientos relacionados a los mecanismos de expresión genética de tripanosomatidos devienen del desarrollo de protocolos de transfección (DaRocha *et al.*, 2004). Para lograr parásitos transfectantes se evaluaron algunas condiciones de electroporación como el *buffer* de electroporación, el voltaje y el número de pulsos.

Respecto al *buffer* de electroporación, el *buffer* usado en la presente investigación (Hariharan *et al.*, 1993) ha sido empleado por varios investigadores (Chung *et al.*, 1994; Buckner *et al.*, 1996; La Flamme *et al.*, 1996; Martínez *et al.*, 1997; Norris, 1998; Vasquez *et al.*, 1999; Lorenzi *et al.*, 2003; Hyland *et al.*, 2008). Por su parte, DaRocha *et al.* (2004) describe un nuevo *buffer* de electroporación que mejora la eficiencia de la transfección dos veces más que el descrito por Ramirez *et al.* (2000). Pero al evaluar el *buffer* de Hariharan *et al.* (1993) y el de DaRocha *et al.* (2004) bajo condiciones óptimas de electroporación, se observó que ambos permitían obtener parásitos transfectantes.

En cuanto al voltaje y número de pulsos aplicados sobre los parásitos, depende en gran parte del equipo que se tenga disponible. En el presente estudio, las condiciones óptimas encontradas para el equipo de la marca Eppendorf requirieron el uso de dos pulsos de 1000 voltios cada uno. Sin embargo, numerosos investigadores han logrado transfectar usando voltajes que varían entre 300 y 500 voltios, muchos de ellos con una sola descarga y usando equipos de las marcas BTX y/o Bio-Rad (Chung *et al.*, 1994; Buckner *et al.*, 1996; La Flamme *et al.*, 1996; Martínez-Calvillo *et al.*, 1997; Thomas y González, 1997; Norris, 1998; Vasquez *et al.*, 1999; Ramirez *et al.*, 2000; Lorenzi *et al.*, 2003; DaRocha *et al.*, 2004; Guevara *et al.*, 2005; Hyland *et al.*, 2008). Los experimentos realizados empleando dichos voltajes no produjeron

transfectantes viables pues al aplicar el antibiótico de selección G418, todos los parásitos murieron. Las condiciones usadas en esta tesis sólo han sido reportadas para *Trypanosoma brucei* (Eid y Sollner-Webb, 1987; Zomerdijs *et al.*, 1990; Burkard *et al.*, 2007) empleando equipos de las marcas antes mencionadas y una de la marca Reading MA (Eid y Sollner-Webb, 1987).

El número de células y el volumen de resuspensión son también parámetros importantes a considerar. La cantidad de epimastigotes (10^8 - 10^9 parásitos ml^{-1}) que se necesitaron para la electroporación es la usada y recomendada por muchos investigadores ya que este método ocasiona un gran porcentaje de mortalidad. Es por ello que la fase media logarítmica es apropiada para cosechar los parásitos.

En cuanto al volumen de resuspensión, es apropiado que las células y el DNA estén distribuidas de tal forma que ambas puedan estar en contacto al momento de la electroporación. El volumen de resuspensión total (100 μl) fue menor al requerido por una cubeta de electroporación cuya capacidad era de 400 μl (gap de 0.2 cm), sin embargo, sí se lograron obtener parásitos transfectantes. Cabe mencionar que el volumen de resuspensión aplicado fue el recomendado para una cubeta de 0,1 cm (Buckner, comunicación personal).

Respecto a la concentración de DNA usada (100 μg), la frecuencia de la transfección es mayor usando altas concentraciones de DNA como entre 50 y 200 μg (Hariharan *et al.*, 1993; Martínez-Calvillo *et al.*, 1997; Thomas y González, 1997; Norris, 1997; Vasquez *et al.*, 1999; Roy *et al.*, 2000; Da Rocha *et al.*, 2004). Sin embargo, la transfección también ha sido lograda con concentraciones menores de DNA (5-25 μg) (ten Asbrock *et al.*, 1993; Buckner *et al.*, 1996; Ramirez *et al.*, 2000; Ashutosh *et al.*, 2005; Burkard *et al.*, 2007; Hyland *et al.*, 2008).

Selección de parásitos transfectantes

Para la selección de parásitos transfectantes, los plásmidos construidos llevaron el gen de resistencia a la neomicina (*neo*), que es el marcador de selección más usado en la transfección de organismos eucariotas (Yenofky *et al.*, 1990). La

concentración de G418 (500 µg/ml) usada ha sido la ideal para tripanosomátidos (Kelly *et al.*, 1992; Hariharan *et al.*, 1993; Chung *et al.*, 1994; Buckner *et al.* 1996; La Flamme *et al.*, 1996; Vasquez y Levin, 1999; Lorenzi *et al.*, 2003; Guevara *et al.*, 2005) pero también se han reportado concentraciones menores (Martínez-Calvillo *et al.*, 1997; DaRocha *et al.*, 2004) y mayores (Hyland *et al.*, 2008). Otros antibióticos de selección descritos para eucariotas incluyen a la zeocina, blasticidina e hygromicina.

La selección de parásitos *neo^r* se observó entre la tercera y la cuarta semana postelectroporación similar al reportado por otros investigadores (Hariharan *et al.*, 1993, Martínez-Calvillo *et al.*, 1997, Vasquez y Levin, 1999, Ramirez *et al.*, 2000; Ashutosh *et al.*, 2005). También se han reportado tiempos más prolongados como 6 semanas ó 6 meses (Hyland *et al.*, 2008 y DaRocha *et al.*, 2004, respectivamente), pero periodos más prolongados sólo serian requeridos para asegurar la estabilidad de la resistencia. Se debe considerar que el tiempo de selección también depende de la cepa usada, el estadio evolutivo del parásito, la concentración del antibiótico y las secuencias empleadas para la construcción del vector a ser transfectado (Martínez-Calvillo *et al.*, 1997).

De la transfección estable, DNA circular versus linear

La obtención de parásitos transfectantes que expresen el gen β -galactosidasa ha sido lograda electroporando un fragmento de DNA linear del vector pLAC (Buckner *et al.*, 1996). La transfección de epimastigotes de la cepa DH29 con fragmentos de DNA linear de los plásmidos pBS-Neo-Luc y pLAC no fue posible debido a la poca cantidad de DNA obtenida luego de digerirlos y purificarlos. A pesar de varios intentos independientes, no se pudieron obtener parásitos transfectantes lo que motivó el ensayo con DNA circular.

Teniendo en cuenta que las secuencias regulatorias del locus de la calmodulina-ubiquitina 2.65 contenidas en el vector pLAC permitieron la expresión de β -galactosidasa en *T. cruzi* (Buckner *et al.*, 1996) se decidió electroporar los plásmidos pBS-Neo-Luc y pLAC pero, como DNA circular. La obtención de parásitos G418-resistentes y la medición de la actividad luciferasa y β -galactosidasa, demostraron

que la transfección estable también es lograda empleando DNA circular (Hariharan *et al.*, 1993; Martínez-Calvillo *et al.*, 1997; Vasquez y Levin, 1999; Santos y Buck, 2000; Lorenzi *et al.*, 2003) a pesar de que un dogma común sugiere que los tripanosomatidos integran el DNA linear de forma más eficiente que el DNA circular (La Flamme *et al.*, 1996).

La forma de integración de los tres plásmidos transfectados (pBS-Neo-Luc, pR-Luc-Neo y pLAC) aún se está investigando pero, reportes previos indican que las transfecciones realizadas con plásmidos circulares, no se integran (La Flamme *et al.*, 1996; Guevara *et al.*, 2005) sino que conducen a la formación de grandes elementos extra cromosómicos circulares de un tamaño estable (La Flamme *et al.*, 1996). Sin embargo, el mantenimiento de los parásitos transfectantes en ausencia de G418 por más de seis meses y con expresión de luciferasa y β -galactosidasa, hace suponer que los plásmidos pBS-Neo-Luc y pLAC se habrían integrado por recombinación homóloga. Estos resultados no fueron observados por Guevara *et al.* (2005) en parásitos transfectados con un plásmido conteniendo las mismas secuencias UTRs, pues estos requirieron una selección con G418 de forma continua para poder mantener la expresión.

Respecto a los parásitos transfectados con pR-Luc-Neo, existe una mayor probabilidad de que la luciferasa se haya insertado por recombinación homóloga, ya que la presencia del promotor ribosomal conduce a la integración en el locus ribosómico (Martínez-Calvillo *et al.*, 1997; Vasquez y Levin, 1999; Lorenzi *et al.*, 2003). Además, la mayoría de parásitos transfectados con pTREX en su forma circular, integran al menos una copia del vector. Sólo una minoría de las células integran al menos dos copias repetidas en tándem en el locus ribosomal y no se integran en el locus GAPDH (Vasquez y Levin, 1999). Aunque para Guevara *et al.* (2005) los plásmidos circulares recombinan muy poco.

La transfección de pTREX circular también favorecería la selección en un plazo más corto (Martínez-Calvillo *et al.*, 1997) que el transfectado con pTREX linear Lorenzi *et al.* (2003).

Expresión de la luciferasa y de la β -galactosidasa

En los tripanosomatidos, la expresión eficiente de genes depende tanto de la reacción de *trans-splicing* como de la poliadenilación del extremo 3'. En el vector pBS-Neo-Luc y pLAC las secuencias necesarias para llevar a cabo ambos procesos y poder expresar el gen *luc* y *neo*, fueron provistas por las regiones no traducidas (UTRs) del locus 2.65 de la calmodulina-ubiquitina. En el vector pR-Luc-Neo, dichas secuencias fueron provistas por los UTRs de la región promotora del locus del rRNA y mejorada con la región intergénica HX1 localizada *upstream* del locus H1.8, uno de los 4 loci que codifican los genes de las proteínas ribosomales ácidas TcP2 β (Tyler-Cross *et al.*, 1995, Figueroa-Angulo *et al.*, 2003; Lorenzi *et al.*, 2003).

Debido a la naturaleza repetitiva de muchas familias de genes en tripanosomatidos es difícil determinar con frecuencia si un miembro específico de una familia de genes multicopia, como la calmodulina, se expresará o no (Chung *et al.*, 1994) sin embargo, las secuencias derivadas de los UTRs 3' y 5' más las regiones intergénicas de varios de estos genes han contribuido decisivamente en la regulación de la expresión de genes en los parásitos (Weston *et al.*, 1999; Vasquez y Levin, 1999; Bartholomeu *et al.*, 2002; Lorenzi *et al.*, 2003; DaRocha *et al.*, 2004). La expresión no es eficiente usando genes de una sola copia (Texeira *et al.*, 1999). La detección de la actividad de la luciferasa y de la β -galactosidasa en los epimastigotes transfectados con pBS-Neo-Luc y pLAC, en ausencia de cualquier presión de selección, indicaría que los UTRs que rodean al gen Cal A2 estarían normalmente activos. Lo mismo ocurriría con los UTRs que rodean la luciferasa en el vector pTREX.

Después de que los plásmidos son transfectados y para seleccionar aquellos parásitos que insertaron los genes reporteros, se mide la actividad de las enzimas expresadas por dichos genes para verificar su funcionalidad. Respecto a la luciferasa, inicialmente la actividad fue medida en un luminómetro manual empleando como sustrato luciferina preparada (luciferina pura, citrato de sodio 0,5 M y H₂Od). Bajo estas condiciones no se observó actividad por varias semanas, por lo que la

selección de parásitos que insertaron la luciferasa se hizo por PCR. Pero no hubo actividad de la luciferasa en los parásitos que amplificaron el gen *luc* por lo que se hizo un análisis de *western blot* enfrentando un anticuerpo anti-luciferasa contra las proteínas totales de los parásitos transfectados. Los parásitos transfectados con cada uno de los plásmidos construidos mostraron una banda de 61 kD correspondiente a la luciferasa, lo que indicaría que los UTRs serían funcionales y habrían expresado el gen *luc*; sin embargo, las enzimas no mostraron actividad de la luciferasa.

Para descartar problemas técnicos de la detección de la actividad de la luciferasa se evaluaron dos parámetros: el tipo de equipo y el sustrato. Los análisis realizados con un luminómetro manual y otro de placa mostraron nuevamente la carencia de actividad de la luciferasa. Finalmente, al evaluar el sustrato se observó que con la luciferina preparada no se pudo medir la actividad; sin embargo, al emplear el sustrato de un *kit* comercial, ambos luminómetros dieron lecturas muy altas, expresados en unidades relativas de luz (RLUs).

La actividad de la luciferasa pudo ser detectada en los parásitos transfectados con cada uno de los plásmidos construidos (clon L95 y L97). Posteriormente, al evaluar la correlación entre los RLUs y el número de parásitos se comprobó la alta correlación existente ($r^2=0.999$) lo cual concuerda con lo reportado por Roy *et al.* (2000), Ashutosh *et al.* (2005) y Hyland *et al.* (2008). La sensibilidad alcanzada por el ensayo de luciferasa (10^2 parásitos ml^{-1}) fue similar al reportado por Roy *et al.* (2000) y Ashutosh *et al.* (2005) además de ser notablemente superior al reportado para el ensayo de β -galactosidasa (1.25×10^4 parásitos ml^{-1}).

La actividad de la β -galactosidasa pudo ser medida fácilmente en los parásitos de la cepa DH29 transfectados con pLAC (clon L24) siguiendo los protocolos ya estandarizados. La transfección de DNA circular no habría sido impedimento para expresar la enzima. Dos publicaciones han sido reportadas respecto a la transfección estable de β -galactosidasa en *T. cruzi* (Buckner *et al.*, 1999; Vega *et al.*, 2005) pero ambos investigadores emplearon DNA lineal.

La actividad de la luciferasa (clones L95 y L97) y de la β -galactosidasa (clon L24) también han podido ser medidas no sólo en el tiempo sino a través de los diferentes estadios de *T. cruzi* confirmando la transfección estable de ambos genes.

Por lo antes expuesto, la transfección y expresión estable de un determinado gen dependería fundamentalmente de: a) en el aspecto técnico, el voltaje y número de pulsos aplicados; y b) en el aspecto molecular, de las secuencias UTRs propias de la especie en estudio. Así mismo, el uso de plásmidos circulares también sería de gran utilidad en los estudios de genética reversa.

Finalmente, aunque el desarrollo de parásitos de *T. cruzi* con expresión estable de luciferasa, además de la β -galactosidasa, se hayan hecho en una cepa propia de una región, estos serán de gran utilidad en la búsqueda de nuevas drogas tripanosomicidas de una forma más eficiente y rápida.

CONCLUSIONES

1. Los plásmidos contruidos pBS-Neo-Luc y el pR-Luc-Neo, contruidos a partir de los vectores pBS:CL-Neo-01/BC-LacZ-10 y pTREX, son útiles para expresar de forma estable la luciferasa en *T. cruzi*.
2. La transfección estable de *Trypanosoma cruzi* puede ser lograda empleando DNA circular.
3. Los clones de la cepa DH29 (L95 y L97) de *Trypanosoma cruzi* expresan constitutivamente el gen de la luciferasa de la luciérnaga.
4. Con el uso de los clones de la cepa DH29 con expresión estable de luciferasa se pueden detectar desde 10^2 parásitos ml^{-1} .

RECOMENDACIONES

En la presente investigación se ha logrado obtener parásitos de *Trypanosoma cruzi* que expresen de forma estable la luciferasa de la luciérnaga. Sin embargo, se recomienda determinar la ubicación molecular del gen de la luciferasa y el tipo de transfección estable que poseen los plásmidos pBS-Neo-Luc y pR-Luc-Neo.

El *screening* de drogas empleando los parásitos transfectantes desarrollados deberá ser evaluado principalmente contra la forma amastigote, pues aún se carecen de drogas que puedan ser aplicadas durante la fase crónica de la enfermedad. El *screening* de drogas empleando la forma tripomastigote no debe ser descartado.

Existe una gran variabilidad de cepas con diferente grado de virulencia y existen reportes de cepas con resistencia natural al nifurtimox y el benzonidazol. Es por ello que se recomienda desarrollar clones con expresión estable de luciferasa a partir de dichas cepas.

Finalmente se recomienda estandarizar el método de *screening* de drogas anti-*T. cruzi* y hacer estudios en modelos animales y cultivos celulares de macrófagos entre otros.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ajioka J, Swindle J (1993) The calmodulin-ubiquitin associated genes of *Trypanosoma cruzi*: their identification and transcription. *Mol Biochem Parasitol* 57: 127-136.
- Ashutosh, Gupta S, Ramesh, Sundar S, Goyal N (2005) Use of *Leishmania donovani* field isolates expressing the luciferase reporter gene in In Vitro drug screening. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49(9): 3776-3783.
- Bardarov S, Dou H, Eisenach K, Banaiee N, Ya S, Chan J, Jacobs W, Riska P (2003) Detection and drug-susceptibility testing of *M. tuberculosis* from sputum samples using luciferase reporter phage: comparison with the Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) system. *Diag Mic Inf Dis* 45: 53-61.
- Bartholomeu DC, Silva RA, Galvão LMC, El-Sayed N, Donelson JE, Texeira SMR (2002) *Trypanosoma cruzi*: RNA structure and post-transcriptional control of the tubulin gene expression. *Exp Parasitol* 102: 123-133.
- Bellofatto V, Torres-Muñoz JE, Cross GAM (1991) Stable transformation of *Leptomonas seymouri* by circular extrachromosomal elements. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 6711-6715.
- Berens RL, Marr J, Steele da Cruz F, Nelson DJ (1982) Effect of allopurinol on *Trypanosoma cruzi*: metabolism and biological activity in intracellular and bloodstream forms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 22(4): 657-661.
- Boucher N, Wu Y, Dumas C, Dubé M, Sereno D, Breton M, Papadopolou B (2002) A common mechanism of stage-regulated gene expression in *Leishmania* mediated by conserved 3'-untranslated region element. *The Journal of Biological Chemistry* 277(22): 19511-19520.
- Bowman NM, Kawai V, Levy MZ, Cornejo del Carpio JG, Cabrera L, Delgado F, et al (2008) Chagas disease transmission in periurban communities of Arequipa, Peru. *Clin Infect Dis* 46: 1822-1828.

- Buckner F, Verlinde CLM, La Flamme AC, Van Voorhis WC (1996) Efficient technique for screening drugs for activity against *Trypanosoma cruzi* using parasites expressing β -galactosidase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 40(11): 2592-2597.
- Burkard G, Fragoso CM, Roditi I (2007) Highly efficient stable transformation of bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* 153: 220-223.
- Cabrera R, Vega S, Valderrama Y, Cabanillas K, Fernández C, Rodríguez O *et al.* (2009) Probable emergencia de la Enfermedad de Chagas en la Amazonia peruana: reporte de 5 casos en Datem del Marañón, Loreto (2006-2009). En: Abstract Book Colloquium Neglected Tropical Disease of Latin American, 12-14 Nov 2009, Lima-Perú. Pp 73.
- Camargo EP (1964) Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*: origin of trypanosomes in liquid medium. *Rev Inst Med Trop Sao* 6: 93.
- Clayton CE (2002) Life without transcriptional control? From fly to man and back again. *The EMBO Journal* 21(8): 1881-1888.
- Chiari E, Braga de Oliveira A, Soares Raslan D, Mesquita AL, Tavares KG (1991) Screening *in vitro* of natural products against blood forms of *Trypanosoma cruzi*. *Transactions of the Royal Society of tropical medicine and Hygiene* 85: 372-374.
- Chung SH, Gillespie RD, Swindle J (1994) Analyzing expression of the calmodulin and ubiquitin-fusion genes of *Trypanosoma cruzi* using simultaneous, independent dual gene replacements. *Mol Biochem Parasitol* 63: 95-107.
- Croft SL (1986) *In vitro* screens in the experimental chemotherapy of Leishmaniasis and Trypanosomiasis. *Parasitology Today* 2(3): 65-69.
- Croft SL, Walker JJ, Gutteridge WE (1988) Screening of drugs for rapid activity against *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes *in vitro*. *Trop Med Parasit* 39: 145-148.

- DaRocha WD, Silva RA, Bartholomeu DC, Pires SF, Freitas JM, Macedo AM, Vasquez MP, Levin MJ, Texeira SMR (2004) Expression of exogenous gene in *Trypanosoma cruzi*: improving vectors and electroporation protocols. *Parasitol Res* 92: 113-120.
- Da Silva CF, Batista MM, Batista D, de Souza EM, da Silva PB, de Oliveira GM, Meuser AS, Shareef AR, Boykin DW, Soeiro M (2008) In vitro and in vivo studies of the trypanocidal activity of a diarylthiopene diamidine against *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52(9): 3307-3314.
- De Castro SL, Pinto MC, Pinto AV (1994) Screening of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi*: Establishing a structure/activity relationship. *Microbios* 78: 83-90.
- Eid Josiane, Sollner-Webb B (1987) Efficient introduction of plasmid DNA into *Trypanosoma brucei* and transcription of a transfected chimeric gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 7812-7816.
- Figuerola-Angulo E, Martínez-Calvillo S, López-Villaseñor I, Hernández R (2003) Evidence supporting a major promoter in *Trypanosoma cruzi* rRNA gene. *FEMS Microbiology Letters* 225: 221-225.
- Gould SJ, Subramani S (1988) Firefly luciferase as a tool in molecular and cell biology. *Annal Biochem* 175: 5-13.
- Guevara P, Dias M, Rojas A, Crisante G, Abreau-Blanco MT, Umezawa E, Vasquez M, Levin M, Anez N, Ramirez JL (2005) Expression of fluorescent genes in *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* (Kinetoplastida – Trypanosomatidae): its application to parasite-vector biology. *J Med. Entomol* 42(1): 48-56.
- Guzman-Marin E, Zavala-Castro JE, Acosta-Viana KY, Rosado-Barrera MA (1999) Importancia de la caracterización de cepas de *Trypanosoma cruzi*. *Rev Biomed* 10: 177-184.

- Ha DS, Schwarz JK, Turca SJ, Beverly SM (1996) Use of green fluorescence protein as a marker in the transfected *Leishmania*. Mol Biochem Parasitol 77: 57-64.
- Hariharan S, Ajioka J, Swindle J (1993) Stable transformation of *Trypanosoma cruzi*: inactivation of the PUB 12.5 polyubiquitin gene by targeted gene disruption. Mol Biochem Parasitol 57: 15-30.
- Hastings KEM (2005) SL trans-splicing: easy come or easy go? Review. Trends in Genetics 21(4): 240-247.
- Hyland KV, Asfaw SH, Olson CL, Daniels MD, Engman DM (2008) Bioluminescent imaging of *Trypanosoma cruzi* infection. Int J Parasitol 38: 1391-1400.
- Kelly JM, Ward HM, Miles MA, Kendall G (1992) A shuttle vector which facilitates the expression of transfected genes in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania*. Nucleic Acid Research 29(15): 3963-3969.
- La Flamme A, Buckner F, Swindle J, Ajioka J, Van Voorhis WC (1996) *Trypanosoma cruzi*: Expression of interleukin-2 utilizing both supercoiled plasmid and linear DNAs. Experimental Parasitology 83: 159-163.
- Nelson D, Cox M (2005) Lehninger- Principios de Bioquímica. 4th Edición. Editorial Omega.
- Liang X, Haritan A, Uliel S, Michaeli S (2003) Trans and Cis-splicing in trypanosomatids: mechanism, factor and regulation. Eukaryot Cell 2: 830-840.
- Lorenzi HA, Vazquez MP, Levin MJ (2003) Integration of expression vectors into the ribosomal locus of *Trypanosoma cruzi*. Gene 310: 91-99.
- Lu H, Buck GA (1991) Expression of an exogenous gene in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. Mol Biochem Parasitol 44, 109-114.

- Maya JD, Cassels BK, Iturriaga-Vasquez P, Ferreira J, Faúndez M, Galanti N, Ferreira A, Morello A (2007) Mode of Action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. *Comp Biochem Phys* 146: 601-620.
- Matthews K, Tschudi C, Ullu E (1994) A common pyrimidine-rich motif governs trans-splicing and polyadenylation of tubulin polycistronic pre-mRNA in trypanosomes. *Genes Dev* 8: 491-501.
- Martínez-Calvillo S, López I, Hernández R (1997) pRIBOTEX expression vector: a pTEX derivative for a rapid selection of *Trypanosoma cruzi* transfectants. *Gene* 199: 71-76.
- McCulloch R, Vassella E, Burton P, Boshart M, Barry JD (2004) Transformation of monomorphic and pleomorphic *Trypanosoma brucei*. *Methods Mol Biol* 262, 53-86.
- McKerrow JH, Doyle PS, Engel JC, Podust LM, Robertson SA, Ferreira R, Saxton T, Arkim M, Kerr ID, Brinen LS, Craik CS (2009) Two approaches to discovering and developing new drug for Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 104 (2): 263-269.
- Muelas-Serrano S, Nogal-Ruiz JJ, Gomez-Barrio A (2000) Setting of a colorimetric method to determine the viability of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Parasitol Res* 86: 999-1002.
- Náquira C, Cabrera R (2009) Breve reseña histórica de la enfermedad de Chagas, a cien años de su descubrimiento y situación actual en el Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Pública* 26(4): 494-504.
- Norris KA (1998) Stable transfection of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes with the trypomastigote-specific complement regulatory protein cDNA confers complement resistance. *Infection and Immunity* 66(6): 2460-2465.

- Nunes LR, Carvalho MR, Shakarian Am, Buck GA (1997) The transcription promoter of the spliced leader gene from *Trypanosome cruzi*. *Gene* 188: 157-168.
- Organización Mundial de la Salud (1991) Control de la Enfermedad de Chagas. Reporte técnico. Serie 811.
- Organización Mundial de la Salud (2007) Reporte sobre la Enfermedad de Chagas actualizado, Grupo de Trabajo Científico TDR. 17 al 20 abril 2005. Buenos Aires, Argentina.
- Organización Mundial de la Salud (2008) Enfermedad de Chagas: control y eliminación. Informe de la secretaria. 124ava Reunión del Consejo Directivo. 27 de Noviembre del 2008.
- Organización Panamericana de la Salud / Organización Mundial de la Salud (2005) Reporte del grupo de trabajo científico sobre la enfermedad de Chagas. Buenos Aires.
- Paques F, Haber JE (1999) Multiple pathways of recombination induced by doubled-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 63, 349-404.
- Plock A, Sokolowska-Kohler W, Presber W (2001) Application of flow-cytometry and microscopical method to characterize effect of herbal drug in *Leishmania spp.* *Exp. Parasitol* 97: 141-153.
- Ramirez MI, Yamauchi LM, de Freitas Jr LHG, Uemura H, Schenkman S (2000) The use of the green fluorescent protein to monitor and improve transfection in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 111: 235-240.
- Rodrigues Coura J, de Castro S (2002) A critical review on Chagas Disease Chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97(1): 3-24.
- Rolon M, Vega C, Escario JA, Gomez-Barrio A (2006) Development of resazurin microtiter assay for drug sensibility testing of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Parasitol Res* 99(2): 103-107.

- Roy G, Dumas C, Sereno D, Wu Y, Singh AK, Tremblay MJ, Ouellette M, Olivier M, Papadopoulou B (2000) Episomal and stable expression of the luciferase reporter gene for quantifying *Leishmania* spp. Infections in macrophages and in animal models. *Mol Biochem Parasitol* 110: 195-206.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning, a laboratory manual. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. United States of America.
- Santos WG, Buck G (2000) Simultaneous stable expression of neomycin phosphotransferase and green fluorescence protein genes in *Trypanosoma cruzi*. *J Parasitol* 86(6): 1281-1288.
- Seeber F, Boothroyd JC (1996) *Escherichia coli* β -Galactosidase as an in vitro and in vivo reporter enzyme and stable transfection marker in the intracellular protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Gene* 169: 39-45.
- Schmunis GA, Cruz JR (2005) Safety of the blood supply in Latin America. *Clin Microbiol Rev.* 18: 12-29.
- Solís H, Huamán A, Ávila G, Ferrer A, Sáez G, diestro A *et al.* (2008) Comunicación preliminar sobre la presencia de *Trypanosoma cruzi* en el distrito de Campoverde (Departamento de Ucayali, Perú). *An Fac Med (Lima)* 70 (supl.): s18
- Taylor MC, Kelly JM (2006) pTcINDEX: a stable tetracycline-regulated expression vector for *Trypanosoma cruzi*. *BMC Biotechnology* 6:32.
- ten Asbroek ALMA, Mol CAAM, Kieft R, Borst P (1993) Stable transformation of *Trypanosome brucei*. *Mol Biochem Parasitol* 59: 133-142.
- Texeira SMR, Otsu K, Hill KL, Kirchhoff LV, Donelson JE (1999) Expression of a marker for intracellular *Trypanosoma cruzi* amastigotes in extracellular spheromastigotes. *Mol Biochem Parasitol* 98: 265-270.

- Thomas M, González A (1997) A transformation vector for stage-specific expression of heterologous genes in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Parasitol Res* 83: 151-156.
- Tyler-Cross RE, Short SL, Floeter-Winter LM, Buck GA (1995) Transient expression mediated by the *Trypanosoma cruzi* rRNA promoter. *Mol Biochem Parasitol* 72: 23-31.
- Vargas Vázquez F (2005) Epidemiología molecular de la tripanosomiasis Americana (*Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma rangely*) en la región norte y nororiental del Perú. Tesis doctoral. Universidad de Granada. España
- Vega S, Náquira C, Cáceres A, Purisaca E, Gonzales L, Sánchez E, *et al.* (2005) Seroprevalencia de la tripanosomiasis americana en los departamentos de Amazonas, Cajamarca – Perú 2002. *Parasitol Latinoam* 60(supl 1): S157.
- Vega C, Rolon M, Martínez-Fernandez, Escario JA, Gómez-Bario (2005) A new pharmacological screening assay with *Trypanosoma cruzi* epimastigotes expressing β -galactosidase. *Parasitol Res* 95: 296-298.
- Vasquez P, Levin M (1999) Functional analysis of the intergenic region of TcP2 β gene loci allowed the construction of an improved *Trypanosoma cruzi* expression vector. *Gene* 239: 217-225.
- Weston D, La Flamme AC, Van Voorhis WC (1999) Expression of *Trypanosoma cruzi* surface antigen FL-160 is controlled by elements in the 3'untranslated, 3'intergenic, and the coding regions. *Mol Biochem Parasitol* 102: 53-66.
- Wet JR, Wood Keith, DeLuca M, Helinski DR, Subramani S (1987) Firefly luciferase gene: Structure and expression in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 7: 725-737.
- Wood KV (1995) The Chemical Mechanism and Evolutionary Development of Beetle Bioluminescence. *Photochem Photobiol* 62, 662-673.

Yenofky RL, Fine M, Pellow, JW (1990) A mutant neomycin phosphotransferase II gene reduces resistance of transformants to antibiotic selection vector. Proc. Natl. Acad Sci USA 87: 3435-3439.

Zomerdijk JC, Ouellette M, ten Asbroek A, Kieft R, Bommer AM, Clayton E, Borst P (1990) The promoter for a variant surface glycoprotein gene expression site in *Trypanosoma brucei*. The EMBO Journal 9(9): 2791-2801.

ANEXOS

Anexo 1. Medios y *buffers* usados en la presente tesis

Medio LIT	NaCl 68 mM; KCl 5.5 mM; Na ₂ HPO ₄ 5.6 mM; Glucosa 11 mM; Tryptosa al 0.5%; LIT al 0.5%; Haemin 4 mg/ml; FBS al 10%; penicilina 1000 000 U; gentamicina 40 mg/ml; pH 7.2
Medio RPMI	RPMI 1640 al 1,04%, NaHCO ₃ 25,3 mM, glutamina 200 mM, HEPES 25 mM, FBS al 10%, penicilina 5000 U ml ⁻¹ , gentamicina 5 mg ml ⁻¹ , pH 7.4
DNA loading dye 10X	EDTA 0.1 M; <i>Bromophenol blue</i> al 0.5%; xilenecyanol al 0.5%; sucrosa al 40%
Laemmli buffer 2X	Tris.HCl 50 mM pH 6.8; SDS al 2%; Bromophenol blue al 0.1 %; Glycerol al 10%; DTT 100 mM
Medio LB y Agar LB	LB 20 g/L; para las placas de Agar se agregó 15 g a 1L de medio LB
<i>Buffer</i> Tris-Glycine	Tris base 25 mM; Glycine 250 mM pH 8.3; SDS al 0.1 %
SSC 1X	Sodium Citrate 15 mM pH 7 ; NaCl 150 mM
PBS	NaCl 132 mM; KCl 3mM, Na ₂ HPO ₄ 8 mM; KH ₂ PO ₄ 1.5 mM pH 7.4
TAE	Tris.HCl 40 mM y NaOAc 40 mM; EDTA 1 mM